(12) **Oversettelse av europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2250498 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.03.25
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.10.31
(86)	Europeisk søknadsnr	09715619.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.02.24
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.11.17
(30)	Prioritet	2008.02.25, US, 31319 2008.10.17, US, 106404 2008.10.24, US, 108384 2008.11.25, US, 117908 2008.12.23, US, 140558
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Nestec S.A., Avenue Nestlé 55, 1800 Vevey, Sveits
(72)	Oppfinner	SINGH, Sharat, P.O. Box 5000PMB 69, Rancho Santa Fe, CA 92067, USA HARVEY, Jeanne, 1554 Arroyo Road, LivermoreCalifornia 94550, USA KIM, Phillip, 28 Exeter, IrvineCalifornia 92612, USA LIU, Xinjun, 12890 Caminito Diego, San DiegoCalifornia 92130, USA LIU, Limin, 13280 Kibbings Road, San DiegoCalifornia 92130, USA BARHAM, Robert, 2081 Meadowlark Ranch Circle, San MarcosCalifornia 92078, USA NERI, Bruce, 2820 Carrillo Way, CarlsbadCalifornia 92008, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Benevnelse **Valg av et legemiddel for brystkreftbehandling ved hjelp av antistoffbaserte arrayer**

(56) Anførte publikasjoner
US-A1- 2003 153 013
US-A1- 2003 153 014
WO-A-03/087761
WO-A-2008/019375
BLUME-JENSEN P ET AL: "ONCOGENIC KINASE SIGNALLING" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 411, no. 6835, 17 May 2001 (2001-05-17), pages 355-365, XP001156920 ISSN: 0028-0836
GEMBITSKY D S ET AL: "A PROTOTYPE ANTIBODY MICROARRAY PLATFORM TO MONITOR CHANGES IN PROTEIN TYROSINE PHOSPHORYLATION" MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 3, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1102-1118, XP002455659 ISSN: 1535-9476
HUDELIST G ET AL: "USE OF HIGH-THROUGHPUT PROTEIN ARRAY FOR PROFILING OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS IN NORMAL AND MALIGNANT BREAST TISSUE" BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, SPRINGER, NEW YORK, NY, vol. 86, no. 3, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 281-291, XP001206326 ISSN: 0167-6806
KOPF ET AL: "Antibody arrays-An emerging tool in cancer proteomics" INTERNATIONAL

JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, EXETER, GB, vol. 39, no. 7-8, 10 July 2007 (2007-07-10), pages 1305-1317, XP022145770 ISSN: 1357-2725
NIELSEN U B ET AL: "Multiplexed sandwich assays in microarray format" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 290, no. 1-2, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 107-120, XP004521984 ISSN: 0022-1759
NIELSEN ULRIK B ET AL: "Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 100, no. 16, 5 August 2003 (2003-08-05), pages 9330-9335, XP002470318 ISSN: 0027-8424

VALG AV ET LEGEMIDDEL FOR BRYSTKREFTBEHANDLING VED HJELP AV ANTISTOFFBASERTE ARRAYER

Beskrivelse

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Signaltransduksjonsprosessen i celler er ansvarlig for en rekke biologiske funksjoner, herunder celledeling og dødsfall, metabolisme, immuncelleaktivering, nevrotransmisjon og sensorisk persepsjon for å nevne bare noen. Forstyrrelser i normal signaltransduksjon i celler kan følgelig føre til en rekke sykdomstilstander slik som diabetes, hjertesykdom, autoimmunitet og kreft.

Én velkarakterisert signaltransduksjonsvei er MAP-kinaseveien, som er ansvarlig for transduksjon av signalet fra epidermal vekstfaktor (EGF) for å fremme cellespredning i celler (se figur 1). EGF binder til en transmembran reseptorbundet tyrosinkinase, epidermal vekstfaktor-reseptoren (EGFR), hvilken aktiveres ved binding av EGF. Bindingen av EGF til EGFR aktiverer tyrosinkinaseaktiviteten til reseptorens cytoplasmiske domene. Én konsekvens av denne kinaseaktiveringen er autofosforyleringen av EGFR på tyrosinrester. De fosforylerte tyrosinrestene på den aktiverte EGFR tilveiebringer et forankringssted for bindingen av SH2-domenet inneholdende adaptorproteiner slik som GRB2. I sin funksjon som adaptor binder GRB2 videre til en guaninnukleotidbyttefaktor, SOS, gjennom et SH3-domene på GRB2. Dannelse av EGFR-GRB2-SOS-komplekset fører til SOS-aktivering av en guaninnukleotidbyttefaktor som fremmer fjerning av GDP fra Ras. Ved fjerning av GDP binder Ras GTP og blir aktivert.

Etter aktivering binder Ras til og aktiverer proteinkinaseaktiviteten til RAF-kinase, en serin/treonin-spesifikk proteinkinase. Deretter følger aktivering av en proteinkinasekaskade som fører til cellespredning. RAF-kinase fosforylerer og aktiverer deretter i grove trekk MEK, en annen serin/treonin-kinase. Aktivert MEK fosforylerer og aktiverer mitogenaktivert proteinkinase (MAPK). Blant målene for ytterligere fosforylering ved hjelp av MAPK er 40S ribosomprotein S6-kinase (RSK). Fosforyleringen av RSK ved hjelp av MAPK resulterer i aktivering av RSK, som i sin tur fosforylerer ribosomprotein S6. Et annet kjent mål for MAPK er proto-onkogenet, c-Myc, et gen som er viktig for cellespredning, hvilket

er mutert ved en rekke krefttyper. MAPK fosforylerer og aktiverer også en annen proteinkinase, MNK, som i sin tur fosforylerer transkripsjonsfaktoren, CREB. MAPK regulerer også indirekte transkripsjonen av Fos-genet, som koder for enda en annen transkripsjonsfaktor som er involvert i cellespredning. Ved endring av disse transkripsjonsfaktorenes nivå og aktivitet transduserer MAPK det opprinnelige ekstracellulære signalet fra EGF til endret transkripsjon av gener som er viktige for cellesyklusprogresjon.

I og med den sentrale rollen som signaltransduksjonsveier spiller i cellevekst, er det ikke overraskende at mange krefttyper oppstår som et resultat av mutasjoner og andre endringer i signaltransduksjonskomponenter som resulterer i unormal aktivering av cellespredningsveier. Overekspresjon av EGFR eller hyperaktivitet har vært assosiert med en rekke krefttyper, herunder glioblastoma multiforme, tykktarmkreft og lungekreft. Dette har fremmet utviklingen av anticancer-behandling rettet mot EGFR, herunder gefitinib og erlotinib for lungekreft, og cetuximab for tykktarmkreft.

Cetuximab er et eksempel på en monoklonalt antistoff-inhibitor, som binder til det ekstracellulære ligandbindingsdomenet på EGFR, hvilket således forhindrer binding av ligander som aktiverer EGFR-tyrosinkinasen. Gefitinib og erlotinib er til sammenligning små molekyler som inhiberer den intracellulært lokaliserte EGFR-tyrosinkinasen. Under fravær av kinaseaktivitet er EGFR ute av stand til å gjennomgå autofosforylering ved tyrosinrester, hvilket er en forutsetning for binding av nedstrøms adaptorproteiner, slik som GRB2. Ved stopp av signaleringskaskaden i celler som er avhengig av denne signalveien for vekst, reduseres tumorspredning og -migrering.

Andre studier har dessuten vist at cirka 70 % av humane melanomer og en mindre fraksjon av andre tumorer har en punktmutasjon (V599E) i Raf-genet som fører til vedvarende aktivering av MAPK-veien (se for eksempel Davies et al., Nature, 417:949–954 (2002)). Slike resultater antyder at mutasjoner i særlige signaltransduksjonsveier kan være karakteristiske for særlige typer av tumorer, og at slike spesifikke, endrede signaltransduksjonsveier kan være et lovende mål for kjemoterapeutisk intervensjon.

Siden forskjellige kreftbehandlinger, særlig kreftkjemoterapi, kan fungere enten direkte eller indirekte ved hjelp av enten blokkering eller aktivering av cellulære signaltransduksjonsveier som er involvert i henholdsvis cellespredning eller -død, kan aktiviteten til en bestemt signaltransduksjonsvei i en særlig form for kreft tjene som en god indikator for virkningen av forskjellige kreftbehandlinger. I tillegg til å fylle andre behov tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for evaluering av effekten av potensielle anticancer-behandlinger for en individuell pasient. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer således fremgangsmåter for å hjelpe en lege med å velge en egnet kreftbehandling ved riktig dose og riktig tid for hver pasient.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter ifølge patentkravene for detektering av aktiveringsstatus for komponenter i signaltransduksjonsveier i tumorceller (f.eks. sirkulerende celler i en brysttumor). Informasjon om aktiveringsstatus for komponenter i signaltransduksjonsveier avledet av utførelse av den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til kreftdiagnose, prognose og utforming av kreftbehandlinger.

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 1 for valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor, idet fremgangsmåten omfatter:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og

(c) bestemmelse av hvorvidt anticancer-legemiddelet er egnet eller uegnet til behandling av brysttumoren ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 1 for valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,

(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og

(d) angivelse av at anticancer-legemiddelet er egnet til behandling av brysttumoren når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for forbedring av valget av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 2 for identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel, idet fremgangsmåten omfatter:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og

(c) identifikasjon av brysttumoren som responsiv eller ikke-responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 2 for identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,

(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og

(d) angivelse av at brysttumoren er responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for forbedring av identifikasjonen av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel.

I enda et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 3 for prediksjon av responsen til en pasient med en brysttumor på behandling med et anticancer-legemiddel, idet fremgangsmåten omfatter:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og

(c) prediksjon av sannsynligheten for at pasienten vil respondere på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 3 for prediksjon av responsen til en pasient med en brysttumor på behandling med et anticancer-legemiddel:
(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,
(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,
(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og
(d) angivelse av at pasienten sannsynligvis vil respondere på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til prediksjon av en pasients sannsynlighet for å respondere på behandling med et anticancer-legemiddel. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for forbedring av prediksjonen av en pasients sannsynlighet for å respondere på behandling med et anticancer-legemiddel.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen anvendelse av et array med forbedret dynamisk område omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som fastholdes på et fast underlag, hvor innfangingsantistoffene i hver fortynningsserie er spesifikke for én eller flere analytter tilsvarende en komponent i en signaltransduksjonsvei i en cellulær ekstrakt i en fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen. De adresserbare arrayene beskrevet heri er særlig nyttige for bestemmelse av ekspresjonen og/eller

aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler og andre proteiner som er involvert i brystkreft.

Andre formål, trekk og fordeler med den foreliggende oppfinnelsen vil være åpenbare for en fagperson på grunnlag av den følgende detaljerte beskrivelsen og figurene.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGEN

Figur 1 viser et eksempel på en signaltransduksjonsvei som er involvert i cellespredning som kan anvendes ved utførelse av oppfinnelsen. Det vises komponenter av EGFR/MAPK/ERK-veien som anvendes av celler til å omdanne et mitogent signal til cellespredning.

Figur 2 viser én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen hvor proksimitetsassayene beskrevet heri detekterte fosforylert EGFR (pEGFR) og fosforylert HER-2 (pHER-2) med enkeltcellesensitivitet.

Figur 3 viser at proksimitetsassayene beskrevet heri resulterte i svært spesifikke assayer for detektering av HER-2 på enkeltcellenivå bare i celler som uttrykker HER-2.

Figur 4 viser skjematisk anvendelsen av de adresserbare arrayene ifølge oppfinnelsen for legemiddelvalg gjennom hele kreftbehandlingens forløp.

Figur 5 viser et skjematisk eksempel på et adresserbart array omfattende fortynninger av antistoffer til komponenter i en reseptortyrosinkinasevei, slik som dem i EGFR/MAPK/ERK-veien. Antistoffer plasseres tredobbelt i fire forskjellige fortynninger på det adresserbare arrayet.

Figur 6 viser et skjematisk eksempel på et adresserbart array omfattende fortynninger av antistoffer til komponenter i signaltransduksjonsveier som aktiveres ved tumorangiogenese. Antistoffer plasseres tredobbelt i fire forskjellige fortynninger på det adresserbare arrayet.

Figur 7 viser et skjematisk eksempel på et alternativt adresserbart array omfattende fortynninger av antistoffer til komponenter av signaltransduksjonsveier som aktiveres ved tumorangiogenese. Antistoffer plasseres tredobbelt i fire forskjellige fortynninger på det adresserbare arrayet.

Figur 8 viser et skjematisk eksempel på et adresserbart array omfattende fortynninger av antistoffer til komponenter i en reseptortyrosinkinasevei og signaltransduksjonsveier som aktiveres ved tumorangiogenese. Antistoffer plasseres tredobbelt i fire forskjellige fortynninger på det adresserbare arrayet.

Figur 9 viser et skjematisk eksempel på et alternativt adresserbart array omfattende fortynninger av antistoffer til komponenter i en reseptortyrosinkinasevei og signaltransduksjonsveier som aktiveres ved tumorangiogenese. Antistoffer kan plasseres tredobbelt i en fortynningsserie på det adresserbare arrayet.

Figur 10 viser de relative fosforyleringsnivåene av EGFR for 5 brystkreft- og 6 normalprøver. Dataene er også vist i tabell 40.

Figur 11 viser de relative fosforyleringsnivåene av HER-2 for 5 brystkreft- og 6 normalprøver. Dataene er også vist i tabell 41.

Figur 12 viser bilder av CTC-farging på Veridex Cell Search™-systemet for 5 brystkreftpasienter. Cellelinjekontrollene er A431 (positiv for EGFR) og SKBr3 (positiv for HER-2).

Figur 13 viser at HER-2 (ErbB2) av full lengde kan fjernes fra en pasientprøve ved hjelp av antistoffer som binder til det ekstracellulære domenet på ErbB2 som er bundet til en polystyrenkule eller et polymert dekstran.

Figur 14 viser en fremgangsmåte for detektering av trunkerte reseptorer slik som p95ErbB2. SA = streptavidin, HRP = pepperrotperoksidase, TSA = tyramidsignalamplifikasjon.

Figur 15 viser at forhåndsbehandling med kuler overtrukket med et antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet (ECD) på ErbB2 (HER-2) nesten

fullstendig fjernet ErbB2-signalet av full lengde uten å påvirke signalet fra ErbB2s intracellulære domene (ICD).

Figur 16 viser at behandling med APMA ((4-aminofenyl)kvikksølvacetat) økte p95ErbB2-fosforylering i BT-474-celler.

Figur 17 viser at heregulin økte p95ErbB2-fosforylering i T47D-celler.

Figur 18 viser flere punkter hvor fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til å påvirke klinisk praksis med hensyn til valg av egnet brystkreftbehandling for en særlig pasient.

Figur 19 viser én utførelsesform av assayformatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, hvilken er avhengig av samtidig lokalisering av to ytterligere detektorantistoffer bundet med enzymer for etterfølgende kanaliseringshendelser for hvert bundet målprotein.

Figur 20 viser enkeltcellesensitivitet for pHER-1- og pHER-2-assayer.

Figur 21 viser ErbB-ekspresjon/-aktivering med EGF- eller HRG β-behandling i forskjellige cellelinjer.

Figur 22 viser T47D ErbB RTK-profilen med EGF- eller HRG β-stimulering.

Figur 23 viser et eksempel på en utførelsesform av et ErbB-signalveiarray.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

I. Innledning

Aktivering av signaltransduksjonsveier som er involvert i cellespredning, og deaktivering av signalveier som er involvert i celledød, er som beskrevet ovenfor ikke-begrensende eksempler på molekylære trekk som karakteriserer mange forskjellige krefttyper. I mange tilfeller kan aktiviteten til særlige signaltransduksjonsveier, og komponenter derav, tjene som molekylære signaturer for en bestemt krefttype. Slike aktiverte komponenter kan videre

tilveiebringe nyttige mål for terapeutisk intervensjon. Kunnskap om aktivitetsnivået til et særlig signaltransduksjonssystem innenfor en kreftcelle før, under og etter behandling gir følgelig en lege svært relevant informasjon som kan anvendes til å velge et egnet behandlingsløp som kan benyttes. Den fortsatte overvåkningen av signaltransduksjonsveier som er aktive i kreftceller etter hvert som behandlingen skrider frem, kan videre gi legen ytterligere informasjon om virkningen av behandlingen og oppfordre legen til enten å fortsette et særlig behandlingsløp eller bytte til en annen behandlingslinje når for eksempel kreftceller er blitt resistente overfor behandling gjennom ytterligere abnormaliteter som aktiverer enten samme eller en annen signaltransduksjonsvei.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer således fremgangsmåter ifølge patentkravene for detektering av ekspresjonen og aktiveringsstatus for et flertall av deregulerte signaltransduksjonsmolekyler i tumorvev eller ekstratumorale celler slik som sjeldne sirkulerende celler i en fast tumor i et spesifikt, multiplekset assay med høy gjennomstrømning. Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for valg av egnet behandling (enkle legemidler eller kombinasjoner av legemidler) for å nedregulere eller stoppe en deregulert signalvei. Oppfinnelsen kan således anvendes til å lette utformingen av personlig tilpassede behandlinger for kreftpasienter.

Evnen til å detektere og identifisere tumorceller i sirkulasjonen gjennom bestemmelse av signaltransduksjonsveienes aktivitet på enkeltcellenivå er en viktig fordel med den foreliggende oppfinnelsen. Tumorceller detekteres ofte i blodet hos pasienter med forskjellige tidlige stadier av kreft som "mikrometastaser" (disseminerte tumorceller) og detekteres også ved metastatiske krefttyper. Antallet av tumorceller i blod vil avhenge av tumorens stadium og type. Mens det typisk tas biopsier på primære tumorer, tas det ikke biopsi av de fleste metastatiske tumorer, hvilket gjør molekylær analyse av slike tumorprøver svært vanskelig. Under tumormetastase forlater de mest aggressive tumorcellene primærtumoren og går gjennom blodet og lymfesystemet for å nå et fjerntliggende sted. Sirkulerende tumorceller fra blod representerer således den mest aggressive og homogene populasjonen av tumorceller. Men antallet av metastatiske tumorceller i blod er ofte svært lavt og varierer fra én til flere tusen celler per milliliter blod. Evnen til å isolere og analysere signaltransduksjonsveier

i slike sjeldne celler og anvende denne informasjonen med sikte på mer virkningsfulle kreftbehandlinger er ett formål med den foreliggende oppfinnelsen.

Nielsen et al., PNAS 100 (16), 2003, 9330–9335, beskriver ratiometriske antistoffarrayer som identifiserer aktiveringen av tyrosinkinaser. Nielsen et al., J. Immunol. Meth. 290 (1–2), 2004, 107–120, beskriver multipleksede sandwichassayer i mikroarrayformat.

I noen utførelsesformer kan de multipleksede immunassayene med høy gjennomstrømning ifølge den foreliggende oppfinnelsen detektere aktiveringsstatus for ett eller flere signaltransduksjonsmolekyler i sirkulerende celler i en fast tumor på enkeltcellenivå. Signaltransduksjonsmolekyler slik som EGFR kan faktisk detekteres med en sensitivitet på cirka 100 zeptomol og et lineært dynamisk område fra cirka 100 zeptomol til cirka 100 femtomol. Enkeltcelledetektering av aktiveringsstatus for multiple signaltransdusere i sjeldne sirkulerende celler letter således kreftprognose og -diagnose og utforming av personlige, målrettede behandlinger.

Sjeldne sirkulerende celler inkluderer sirkulerende celler i en fast tumor som enten har metastasert eller mikrometastasert fra en fast tumor. Sirkulerende tumorceller, kreftstamceller og celler som migrerer til en tumor (f.eks. på grunn av kjemoattraksjon) slik som sirkulerende endoteliale progenitorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende pro-angiogene myeloide celler og sirkulerende dendrittiske celler er noen eksempler på sirkulerende celler assosiert med en fast tumor.

Aktuelle signaltransduksjonsmolekyler ekstraheres typisk kort etter at de sirkulerende cellene er isolert for å bevare deres aktiveringsstatus *in situ*, foretrukket innen cirka 24, 6 eller 1 t, og mer foretrukket innen cirka 30, 15 eller 5 minutter. De isolerte cellene kan også inkuberes med én eller flere vekstfaktorer, vanligvis ved nanomolare til mikromolare konsentrasjoner, i cirka 1–30 minutter for å gjenopprette eller stimulere aktivering av signaltransduksjonsmolekylene (se for eksempel Irish et al., Cell, 118:217–228 (2004)).

For å evaluere potensielle anticancer-behandlinger for en individuell pasient kan de isolerte cellene som forklart nærmere heri inkuberes med ett eller flere anticancer-legemidler ved varierende doser. Vekstfaktorstimulering kan deretter utføres i noen minutter (f.eks. cirka 1–5 minutter) eller i flere timer (f.eks. cirka 1–6 timer). Den differensielle aktiveringen av signalveier med og uten anticancer-legemidler kan være til hjelp for valg av en egnet kreftbehandling ved riktig dose for hver individuell pasient. Sirkulerende celler kan også isoleres fra en pasientprøve under anticancer-legemiddelbehandling og stimuleres med én eller flere vekstfaktorer for å bestemme om en endring i behandling bør gjennomføres. Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen bidrar således med fordel til å tilveiebringe riktig anticancer-legemiddel ved riktig dose på riktig tidspunkt for hver pasient.

Med hensyn til brystkreft er nåværende testalternativer utilfredsstillende fordi behandling av både primære og metastatiske tumorer hos en brystkreftpasient er basert på en diagnose på ett tidspunkt fra en biopsiprøve som er tatt på et tidlig stadium av sykdommen. Særlig er terapeutisk intervensjon for både de tidlige og metastatiske stadiene av brystkreft utelukkende basert på den initiale diagnosen fra biopsiprøven som ble tatt på et tidlig stadium av sykdommen på grunn av hvor upraktisk det er å oppnå en biopsiprøve fra en metastatisk kreftpasient. Men brysttumorer utvikler seg som en funksjon av tid og behandling, slik at tidsovervåkning av brysttumorer er kritisk for optimal behandling av brystkreftpasienter. En endring i aktiveringsstatus for én eller flere av ErbB (HER)-familien av reseptortyrosinkinaser kan således påvirke behandlingsvalg ved tilbakefall. Avvik i HER-2-status mellom primær og metastatisk kreft er faktisk vanlig fordi opp til 37 % av alle brystkreftpasienter går fra en HER-2-negativ primærtumor til en HER-2-positiv metastatisk kreft. Pasienter kan dessuten ha *de novo*-resistens eller utvikle ervervet resistens overfor hormonbehandling på grunn av HER-1/2-aktivering. I noen tilfeller kan pasienter ha *de novo*-resistens eller utvikle ervervet resistens overfor ErbB-målrettede behandlinger på grunn av forekomst av tumorceller som uttrykker p95HER-2. Det er følgelig et udekket klinisk behov for assayer som hjelper legen med å bestemme egnet kreftbehandling på riktig tidspunkt fordi nåværende teknologi mangler sensitivitet og spesifisitet, kan ikke anvendes til å overvåke pasienter under behandling og benytter ikke signalveiprofilering til å styre individuelt tilpassede behandlingsbeslutninger.

I motsetning til nåværende tilgjengelige brystkrefttestalternativer sikrer fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen overvåkning av brystkreftpasienter gjennom alle stadiene av sykdommen ved å tilveiebringe en "sanntidsbiopsi" av faste brysttumorer ved hjelp av prøver slik som sirkulerende tumorceller (CTC-er) fra blod og/eller finnålsaspirater (FNA-er). Som et ikke-begrensende eksempel kan brystkreftassayene beskrevet heri anvendes til den initiale diagnosen av brystkreft hos en pasient på et tidlig stadium av sykdommen. Valg av en egnet kreftbehandling styres ved hjelp av profilering av aktiveringsstatus for spesifikke signalveier med og uten anticancer-legemidler ved hjelp av de enkle deteksjons- og proksimitetsassayene beskrevet heri. Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan med fordel også anvendes til å overvåke sykdommens progresjon eller regresjon siden terapeutisk intervensjon kan være basert på prøver som er tatt på et hvilket som helst stadium av sykdommen og analysert ved hjelp av de enkle deteksjons- og proksimitetsassayene beskrevet heri. Valg av egnede kreftbehandlinger for de tidlige og metastatiske stadiene av brystkreft styres av sanntidsdiagnose og en analyse av aktiveringsstatus for spesifikke signalveimolekyler.

Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen skreddersys med fordel for å få bukt med sentrale problemer ved kreftbehandling og tilveiebringe en høyere pleiestandard for brystkreftpasienter fordi de (1) tilveiebringer økt sensitivitet (f.eks. kan enkeltcelledetektering oppnås for detektering av totale og fosforylerte signaltransduksjonsmolekyler slik som EGFR og HER-2), (2) tilveiebringer økt spesifisitet (f.eks. forbedrer tre antistoffproksimitetsassayer spesifisiteten for detektering av fosforylerte signaltransduksjonsmolekyler), (3) sikrer signalveiprofilering (f.eks. kan aktiveringsstatus for spesifikke signaltransduksjonsmolekyler detekteres i CTC-er eller FNA fra pasienter) og (4) eliminerer eventuelle problemer med å oppnå pasientprøver (f.eks. kan det utføres assayer på noen tumorceller). Selv om en hvilken som helst prøve kan anvendes i de hittil ukjente assayene beskrevet heri, er CTC-er særlig nyttige fordi de representerer de mest aggressive tumorcellene, hver tumor er kjent for å avgi CTC-er, de kan være den eneste kilden til resterende tumorer eller vanskelig tilgjengelige metastatiske tumorer, og de er detektert i blod. Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen sikrer således seriell prøvetaking av brysttumorvev, hvilket resulterer i verdifull informasjon om

endringer i tumorceller som en funksjon av tid og behandling, og hvilket forsyner leger med et middel til å overvåke hurtig utviklende signalveisignaturer for kreft.

Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer alt i alt med fordel nøyaktig valg og overvåkning av kreftpasienter (f.eks. brystkreftpasienter), som mest sannsynligvis drar fordel av målrettet behandling ved utførelse av signalveiprofilering på enkelt tilgjengelige tumorceller ved hjelp av multipleksede, antistoffbaserte enkle deteksjons- eller proksimitetsassayer.

II. Definisjoner

Følgende betegnelser har som anvendt heri den angitte betydning, med mindre noe annet er angitt.

Betegnelsen "kreft" er ment å inkludere et hvilket som helst medlem av en klasse av sykdommer karakterisert ved ukontrollert vekst av unormale celler. Betegnelsen inkluderer alle kjente krefttyper og neoplastiske tilstander, enten de er karakterisert som ondartede, godartede, mykvevsrelaterte eller faste, og krefttyper i alle stadier og grader, herunder pre- og post-metastatiske krefttyper. Eksempler på forskjellige typer av kreft inkluderer blant annet brystkreft, lungekreft (f.eks. ikke-småcellet lungekreft), digestive og gastrointestinale krefttyper slik som kolorektalkreft, gastrointestinale stromale tumorer, gastrointestinale karsinoide tumorer, tykktarmkreft, rektalkreft, analkreft, gallegangskreft, tynntarmkreft og magekreft, spiserørskreft, galleblærekreft, leverkreft, bukspyttkjertelkreft, blindtarmkreft, eggstokkreft, nyrekreft (f.eks. nyrecellekarsinom), kreft i sentralnervesystemet, hudkreft, lymfomer, koriokarsinomer, hode- og halskrefttyper, osteogene sarkomer og blodkrefttyper. En "tumor" omfatter som anvendt heri én eller flere kreftfremkallende celler. I én foretrukket utførelsesform er brysttumoren avledet fra en pasient med en invasiv form eller in situ-form av duktalt karsinom eller lobulært karsinom. I en annen foretrukket utførelsesform er brysttumoren avledet fra en pasient med tilbakevendende eller metastatisk brystkreft.

Betegnelsen "analytt" inkluderer et hvilket som helst aktuelt molekyl, typisk et makromolekyl slik som et polypeptid, hvis forekomst, mengde og/eller identitet

er bestemt. I visse tilfeller er analytten en cellulær komponent i sirkulerende celler i en fast tumor, foretrukket et signaltransduksjonsmolekyl.

Betegnelsen "fortynningsserie" er som anvendt heri ment å inkludere en serie av reduserende konsentrasjoner av en særlig prøve (f.eks. cellelysat) eller reagens (f.eks. antistoff). En fortynningsserie produseres typisk ved en fremgangsmåte for blanding av en målt mengde av en utgangskonsentrasjon av en prøve eller et reagens med et fortynningsmiddel (f.eks. fortynningsbuffer) for å danne en nedre konsentrasjon av prøven eller reagenset, og gjentagelse av fremgangsmåten nok ganger til å oppnå ønsket antall av seriefortynninger. Prøven eller reagenset kan være fortynnet i serie minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 eller 1000 ganger for å produsere en fortynningsserie omfattende minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 eller 50 reduserende konsentrasjoner av prøven eller reagenset. En fortynningsserie omfattende en 2 ganger seriefortynning av et innfangingsantistoffreagens ved en 1 mg/ml utgangskonsentrasjon kan for eksempel produseres ved blanding av en mengde av utgangskonsentrasjonen av innfangingsantistoff med en lik mengde av en fortynningsbuffer for å danne en 0,5 mg/ml konsentrasjon av innfangingsantistoffet, og gjentagelse av fremgangsmåten for å oppnå innfangingsantistoffkonsentrasjoner på 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml osv.

Betegnelsen "forbedret dynamisk område" betyr som anvendt heri et assays evne til å detektere en spesifikk analytt i så få som én celle eller i så mange som tusenvis av celler. Immunassayene beskrevet heri har for eksempel et forbedret dynamisk område fordi de med fordel detekterer et særlig aktuelt signaltransduksjonsmolekyl i cirka 1–10 000 celler (f.eks. cirka 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 eller 10 000 celler) ved hjelp av en fortynningsserie av innfangingsantistoffkonsentrasjoner.

Betegnelsen "signaltransduksjonsmolekyl" eller "signaltransduser" inkluderer proteiner og andre molekyler som gjennomfører fremgangsmåten hvorved en celle omdanner et ekstracellulært signal eller stimulering til en respons, hvilket typisk involverer ordnede sekvenser av biokjemiske reaksjoner i cellen. Eksempler på signaltransduksjonsmolekyler inkluderer blant annet

reseptortyrosinkinaser slik som EGFR (f.eks. EGFR/HER-1/ErbB1, HER-2/Neu/ErbB2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (f.eks. PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (insulinreseptor), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (insulinreseptorrelatert reseptor), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-kadherin, LTK (leukocyttyrosinkinase), ALK (anaplastisk lymfomkinase), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, RTK 106 og trunkerte former av reseptortyrosinkinasene slik som p95ErbB2, ikke-reseptortyrosinkinaser slik som BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack og LIMK, tyrosinkinasesignaliseringskaskade-komponenter slik som Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), PI3K, Ras (f.eks. K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6-kinase, p53, syklin D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 og paxillin, nukleære hormonreseptorer slik som østrogenreseptor (ER), progesteronreseptor (PR), androgenreseptor, glukokortikoidreseptor, mineralkortikoidreseptor, vitamin A-reseptor, vitamin D-reseptor, retinoidreseptor, tyroidhormonreseptor, og orphanreseptorer, nukleære reseptorkoaktivatorer og repressorer slik som amplifisert ved henholdsvis brystkreft 1 (AIB1) og nukleær reseptorkorepressor 1 (NCOR) og kombinasjoner derav.

Betegnelsen "sirkulerende celler" omfatter som anvendt heri ekstratumorale celler som enten har metastasert eller mikrometastasert fra en fast tumor. Eksempler på sirkulerende celler inkluderer blant annet sirkulerende tumorceller, kreftstamceller og/eller celler som migrerer til tumoren (f.eks. sirkulerende endoteliale progenitorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende pro-angiogene myeloide celler, sirkulerende dendrittiske celler osv.).

Betegnelsen "prøve" inkluderer som anvendt heri en hvilken som helst biologisk prøve oppnådd fra en pasient. Prøver inkluderer blant annet fullblod, plasma, serum, røde blodceller, hvite blodceller (f.eks. mononukleære perifere blodceller), duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe (f.eks. disseminerte tumorceller i lymfeknuten), benmargsaspirat, saliva, urin, avføring (dvs. ekskrementer), spytt, bronkialt lavagefluid, tårer, finnålsaspirat (f.eks. høstet ved tilfeldig periareolar finnålsaspirasjon), alle andre kroppsvæsker, en

vevsprøve (f.eks. tumorvev) slik som en biopsi av en tumor (f.eks. nålbiopsi) eller en lymfeknute (f.eks. vaktpostlymfeknutebiopsi) og cellulære ekstrakter derav. I noen utførelsesformer er prøven fullblod eller en fraksjonskomponent derav slik som plasma, serum eller en cellepellet. I foretrukne utførelsesformer er prøven oppnådd ved isolering av sirkulerende celler i en fast tumor fra fullblod eller en cellulær fraksjon derav ved hjelp av en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken. I andre utførelsesformer er prøven en FFPE-tumorvevsprøve, f.eks. fra en fast tumor i brystet.

En "biopsi" betyr fremgangsmåten for fjerning av en vevsprøve for diagnostisk eller prognostisk evaluering, og vevsprøven i seg selv. Enhver biopsiteknikk som er kjent i teknikken, kan anvendes til fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Den anvendte biopsiteknikken vil generelt avhenge av blant annet vevstype som skal evalueres, og tumorens størrelse og type (dvs. fast eller suspendert (dvs. blod eller ascites)). Representative biopsiteknikker inkluderer eksisjonsbiopsi, insisjonsbiopsi, nålbiopsi (f.eks. kjernenålsbiopsi, finnålsaspirasjonsbiopsi osv.), kirurgisk biopsi og benmargsbiopsi. Biopsiteknikker er drøftet for eksempel i Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16th ed., 2005, kapittel 70, og gjennom hele del V. En fagperson vil forstå at det kan utføres biopsiteknikker for å identifisere kreftfremkallende og/eller pre-kreftfremkallende celler i en bestemt vevsprøve.

Betegnelsen "pasient" eller "person" inkluderer typisk mennesker, men kan også inkludere andre dyr slik som for eksempel andre primater, gnagere, hunder, katter, hester, sauer, svin og lignende.

Et "array" eller "mikroarray" omfatter et distinktivt sett og/eller fortynningsserie av innfangingsantistoffer som er immobilisert eller fastholdt på et fast underlag slik som for eksempel glass (f.eks. en glassplate), plast, brikker, stifter, filtere, kuler (f.eks. magnetkuler, polystyrenkuler osv.), papir, membran (f.eks. nylon, nitrocellulose, polyvinylidenfluorid (PVDF) osv.), fiberbunter eller et hvilket som helst annet egnet substrat. Innfangingsantistoffene immobiliseres eller fastholdes generelt på det faste underlaget via kovalente eller ikke-kovalente interaksjoner (f.eks. ioniske bindinger, hydrofobe interaksjoner, hydrogenbindinger, van der Waals-krefter, dipole-dipole bindinger). I visse

tilfeller omfatter innfangingsantistoffene innfangingsmerker som interagerer med innfangingsmidler bundet til det faste underlaget. Arrayene som anvendes i assayene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, omfatter typisk et flertall av forskjellige innfangingsantistoffer og/eller innfangingsantistoffkonsentrasjoner som er bundet til overflaten av et fast underlag på forskjellige kjente/adresserbare steder.

Betegnelsen "innfangingsantistoff" er ment å inkludere et immobilisert antistoff som er spesifikt for (dvs. binder, er bundet av eller danner et kompleks med) én eller flere aktuelle analytter i en prøve slik som en cellulær ekstrakt av sirkulerende celler i en fast tumor. I foretrukne utførelsesformer fastholdes innfangingsantistoffet på et fast underlag i et array. Egnede innfangingsantistoffer for immobilisering av et hvilket som helst av en rekke signaltransduksjonsmolekyler på et fast underlag er tilgjengelige fra Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) og BD Biosciences (San Jose, CA).

Betegnelsen "deteksjonsantistoff" inkluderer som anvendt heri et antistoff omfattende et detekterbart merke som er spesifikt for (dvs. binder, er bundet av eller danner et kompleks med) én eller flere aktuelle analytter i en prøve. Betegnelsen omfatter også et antistoff som er spesifikt for én eller flere aktuelle analytter, hvor antistoffet kan være bundet av en annen art som omfatter et detekterbart merke. Eksempler på detekterbare merker inkluderer blant annet biotin-/streptavidin-merker, nukleinsyremerker (f.eks. oligonukleotid), kjemisk reaktive merker, fluorescerende merker, enzymmerker, radioaktive merker og kombinasjoner derav. Egnede deteksjonsantistoffer for deteksjon av aktiveringsstatus og/eller total mengde av et hvilket som helst av en rekke signaltransduksjonsmolekyler er tilgjengelige fra Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) og BD Biosciences (San Jose, CA). Som et ikke-begrensende eksempel er fosfo-spesifikke antistoffer mot forskjellige fosforylerte former av signaltransduksjonsmolekyler slik som EGFR, c-KIT, c-Src,

FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Raf og MEK tilgjengelige fra Santa Cruz Biotechnology.

Betegnelsen "aktiveringsstatusavhengig antistoff" inkluderer et deteksjonsantistoff som er spesifikt for (dvs. binder, er bundet av eller danner et kompleks med) en særlig aktiveringsstatus for én eller flere aktuelle analytter i en prøve. I foretrukne utførelsesformer detekterer det aktiveringsstatusavhengige antistoffet fosforylerings-, ubiquinerings- og/eller komplekseringsstatus for én eller flere analytter slik som én eller flere signaltransduksjonsmolekyler. I noen utførelsesformer er fosforyleringen av medlemmer av EGFR-familien av reseptortyrosinkinaser og/eller dannelsen av heterodimere komplekser mellom EGFR-familiemedlemmer detektert ved hjelp av aktiveringsstatusavhengige antistoffer. Ikke-begrensende eksempler på aktiveringsstatus (angitt i parentes) som er egnet til detektering med aktiveringsstatusavhengige antistoffer, inkluderer: EGFR (EGFRvIII, fosforylert (p-) EGFR, EGFR:Shc, ubiquinert (u-) EGFR, p-EGFRvIII), ErbB2 (p95:trunkert (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4), ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc), ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc), ER (p-ER (S118, S167), IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K), INSR (p-INSR), KIT (p-KIT), FLT3 (p-FLT3), HGFRI (p-HGFRI), HGFR2 (p-HGFR2), RET (p-RET), PDGFRa (p-PDGFRa), PDGFRP (p-PDGFRP), VEGFRI (p-VEGFRI, VEGFRI:PLCg, VEGFR1:Src), VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCy, VEGFR2:Src, VEGFR2:heparinsulfat, VEGFR2:VE-kadherin), VEGFR3 (p-VEGFR3), FGFR1 (p-FGFR1), FGFR2 (p-FGFR2), FGFR3 (p-FGFR3), FGFR4 (p-FGFR4), Tie1 (p-Tie1), Tie2 (p-Tie2), EphA (p-EphA); EphB (p-EphB), NFKB og/eller IKB (p-IK (S32), p-NFKB (S536), p-P65:IKBa), Akt (p-Akt (T308, S473)), PTEN (p-PTEN), Bad (p-Bad (S112, S 136), Band:14-3-3), mTor (p-mTor (S2448)), p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)), Mek (p-Mek (S217, S221)), Erk (p-Erk (T202, Y204)), Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)), Jnk (p-Jnk (T183, Y185)), P38 (p-P38 (T180, Y182)), Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)), Fak (p-Fak (Y576)), Rb (p-Rb (S249, T252, S780)), Ki67, p53 (p-p53 (S392, S20)), CREB (p-CREB (S133)), c-Jun (p-c-Jun (S63)), cSrc (p-cSrc (Y416)) og paxillin (p-paxillin (Y118)).

Betegnelsen "aktiveringsstatusuavhengig antistoff" inkluderer et deteksjonsantistoff som er spesifikt for (dvs. binder, er bundet av eller danner et

kompleks med) én eller flere aktuelle analytter i en prøve uavhengig av deres aktiveringsstatus. Det aktiveringsstatusuavhengige antistoffet kan for eksempel detektere både fosforylerte og ufosforylerte former av én eller flere analytter slik som ett eller flere signaltransduksjonsmolekyler.

Betegnelsen "nukleinsyre" eller "polynukleotid" inkluderer deoksyribonukleotider eller ribonukleotider og polymerer derav i enten enkelt- eller dobbelttrådet form slik som for eksempel DNA og RNA. Nukleinsyrer inkluderer nukleinsyrer inneholdende kjente nukleotidanaloger eller modifiserte hovedkjederester eller -bindinger, som er syntetisk, naturlig forekommende, og ikke naturlig forekommende, og som har lignende bindingsegenskaper som referansenukleinsyren. Eksempler på slike analoger inkluderer blant annet fosfortioater, fosforamidater, metylfosfonater, kiral-metyl-fosfonater, 2'-O-metylribonukleotider og peptidnukleinsyrer (PNA-er). Med mindre noe annet er spesifikt angitt, omfatter betegnelsen nukleinsyrer inneholdende kjente analoger av naturlige nukleotider som har lignende bindingsegenskaper som referansenukleinsyren. Med mindre noe annet er angitt, omfatter en særlig nukleinsyresekvens også implisitt konservativt modifiserte varianter derav og komplementære sekvenser samt den eksplisitt angitte sekvensen.

Betegnelsen "oligonukleotid" betyr en enkelttrådet oligomer eller polymer av RNA, DNA, RNA/DNA-hybrid og/eller et mimetikum derav. I visse tilfeller er oligonukleotider sammensatt av naturlig forekommende (dvs. umodifiserte) nukleobaser, sukre og internukleosidbindinger (hovedkjedebindinger). I visse andre tilfeller omfatter oligonukleotider modifiserte nukleobaser, sukre og/eller internukleosidbindinger.

Betegnelsen "uoverensstemmende motiv" eller "uoverensstemmede region" betyr som anvendt heri en del av et oligonukleotid som ikke har 100 % komplementaritet til sin komplementære sekvens. Et oligonukleotid kan ha minst én, to, tre, fire, fem, seks eller flere uoverensstemmende regioner. De uoverensstemmende regionene kan være tilstøtende eller separert av 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eller flere nukleotider. De uoverensstemmende motivene eller regionene kan omfatte en enkelt nukleotid eller to, tre, fire, fem eller flere nukleotider.

Betegnelsen "strenge hybridiseringsbetingelser" betyr betingelser hvorunder et oligonukleotid vil hybridisere til sin komplementære sekvens, men til ingen andre sekvenser. Strenge betingelser er sekvensavhengige og vil være forskjellige under forskjellige omstendigheter. Lengre sekvenser hybridiserer spesifikt ved høyere temperaturer. En omfattende veiledning i hybridisering av nukleinsyrer finnes i Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Strenge betingelser er generelt valgt til å være cirka 5–10 °C lavere enn det termiske smeltepunktet (T_m) for den spesifikke sekvensen ved en definert ionisk styrke, pH. T_m er temperaturen (under definert ionisk styrke, pH og nukleinkonsentrasjon) hvorved 50 % av probene som er komplementære til målet, hybridiserer til målsekvensen ved ekvilibrium (siden målsekvensene er til stede i overskudd, opptas 50 % av probene ved ekvilibrium ved T_m). Det kan også oppnås strenge betingelser ved tilsetning av destabiliserende midler slik som formamid. For selektiv eller spesifikk hybridisering er et positivt signal minst to ganger bakgrunns-, foretrukket 10 ganger bakgrunnshybridisering.

Betegnelsene "i det vesentlige identisk" eller "vesentlig identitet" betyr i sammenheng med to eller flere nukleinsyrer to eller flere sekvenser eller subsekvenser som er like eller har en spesifikk prosentandel av nukleotider som er lik (dvs. minst cirka 60 %, foretrukket minst cirka 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % eller 95 % identitet i en bestemt region) ved sammenligning og justering for største samsvar over et sammenligningsvindu eller utpekt region som målt ved hjelp av en sekvenssammenligningsalgoritme eller ved manuell justering og visuell inspeksjon. Denne definisjonen henviser også, når sammenhengen tillater det, analogt til en sekvens' komplement. Den vesentlige identiteten finnes foretrukket i en region som er minst cirka 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 eller 100 nukleotider i lengde.

Betegnelsen "inkubering" er anvendt synonymt med "opprettelse av kontakt" og "eksponering" og impliserer ikke noe spesifikt tids- eller temperaturkrav, med mindre noe annet er angitt.

III. Beskrivelse av utførelsesformene

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter ifølge patentkravene for detektering av ekspresjonen og aktiveringsstatus for et flertall av deregulerte signaltransdusere i tumorceller avledet fra tumorvev eller sirkulerende celler i en fast tumor i et spesifikt, multiplekset assay med høy gjennomstrømning. Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter ifølge patentkravene for valg av egnede behandlinger for å nedregulere eller stoppe én eller flere deregulerte signalveier. Utførelsesformene av oppfinnelsen kan således anvendes til å lette utformingen av personlig tilpassede behandlinger basert på den særlige molekylære signaturen som tilveiebringes ved samling av aktiverte signaltransduksjonsproteiner i en bestemt pasients tumor.

Sirkulerende celler i en fast tumor inkluderer celler som enten har metastasert eller mikrometastasert fra en fast tumor, herunder kreftstamceller eller celler som migrerer til tumoren (f.eks. på grunn av kjemoattraksjon), slik som endoteliale progenitorceller, sirkulerende endotelceller, pericytter, sirkulerende pro-angiogene myeloidceller, dendrittiske celler osv. Pasientprøver inneholdende de sirkulerende cellene kan oppnås fra et hvilket som helst tilgjengelig biologisk fluid (f.eks. fullblod, serum, plasma, spytt, bronkialt lavagefluid, urin, brystvorteaspirat, lymfe, spytt, finnålsaspirat osv.). I visse tilfeller separeres fullblodsprøven til en plasma- eller serumfraksjon og en cellulær fraksjon (dvs. cellepellet). Den cellulære fraksjonen inneholder typisk røde blodceller, hvite blodceller og/eller sirkulerende celler i en fast tumor slik som sirkulerende tumorceller (CTC-er), sirkulerende endotelceller (CEC-er), sirkulerende endoteliale progenitorceller (CEPC-er), kreftstamceller (CSC-er), disseminerte tumorceller i lymfeknuten og kombinasjoner derav. Plasma- eller serumfraksjonen inneholder vanligvis blant annet nukleinsyrer (f.eks. DNA, RNA) og proteiner som frisettes av sirkulerende celler i en fast tumor.

De sirkulerende cellene isoleres typisk fra en pasientprøve ved hjelp av én eller flere separasjonsfremgangsmåter, herunder for eksempel immunmagnetisk separasjon (se for eksempel Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589–4594 (1998), Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577–582 (2001)), CellTracks®-systemet fra Immunicon (Huntingdon Valley, PA), mikrofluidisk separasjon (se for eksempel Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251–256 (2004), Lin et al., Abstract No. 5147, 97. årsmøte i AACR, Washington, D.C. (2006)), FACS (se for eksempel Mancuso et al., Blood, 97:3658–3661 (2001)),

densitetgradientsentrifugering (se for eksempel Baker et al., Clin. Cancer-Res., 13:4865–4871 (2003)) og nedbrytingsfremgangsmåter (se for eksempel Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521–530 (2002)).

For å bevare aktiveringsstatus *in situ* ekstraheres signaltransduserne med fordel kort etter at cellene er isolert, foretrukket innenfor 96, 72, 48, 24, 6 eller 1 t, mer foretrukket innenfor 30, 15 eller 5 minutter. De isolerte cellene kan også med fordel inkuberes med vekstfaktorer, vanligvis ved nanomolare til mikromolare konsentrasjoner, i cirka 1–30 minutter for å gjenopprette eller stimulere signaltransduseraktivering (se for eksempel Irish et al., Cell, 118:217–228 (2004)). Stimulerende vekstfaktorer inkluderer epidermal vekstfaktor (EGF), heregulin (HRG), TGF-α, PIGF, angiopoietin (Ang), NRG1, PGF, TNF-α" VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, cytokiner og lignende. For å evaluere potensielle anticancer-behandlinger for en individuell pasient kan de isolerte cellene inkuberes med én eller flere anticancer-legemidler av varierende doser før vekstfaktorstimulering. Vekstfaktorstimulering kan utføres i noen minutter eller timer (f.eks. 1–5 minutter til 1–6 timer). Den differensielle aktiveringen av signalveier med og uten anticancer-legemidler er til hjelp for valg av en egnet kreftbehandling ved riktig dose for hver individuell pasient. Etter isolering, behandling med anticancer-middel og/eller vekstfaktorstimulering lyseres cellene for å ekstrahere signaltransduserne ved hjelp av en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken. Foretrukket initieres cellelyseringen mellom cirka 1 og 360 minutter etter vekstfaktorstimulering og mer foretrukket ved to forskjellige tidsintervaller: (1) cirka 1–5 minutter etter vekstfaktorstimulering og (2) mellom cirka 30 og 180 minutter etter vekstfaktorstimulering. Lysatet kan alternativt oppbevares ved -80 °C frem til anvendelse.

I noen utførelsesformer omfatter anticancer-legemiddelet et middel som forstyrrer funksjonen til aktiverte signaltransduksjonsveikomponenter i kreftceller. Ikke-begrensende eksempler på slike midler inkluderer dem angitt nedenfor i tabell 1.

Tabell 1

EGFR (ErbB1) (A)	**HER-2 (ErbB2) (C)**	**HER-3 (ErbB3) (E)**	**HER-4 (ErbB4)-mål**
Cetuksimab Panitumumab Matuzumab Nimotuzumab ErbB1-vaksine	Trastuzumab (Herceptin®) Pertuzumab (DNA) BMS-599626*	Antistoff (U3)	
	*Heterodimerisering HER-1/2, fase 1		
EGFR (ErbB1) (B)	**HER-2 (ErbB2) (D)**	**ErbB1/2 (F)**	**ErbB1/2/4 (G)**
Erlotinib Gefitinib EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer)	Lapatinib (Tykerb®) HKI-272* HKI-357 (preklinisk) BIBW 2992**	Canertinib* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth, irreversibel, II CRC) **(Wyeth, irreversibel, preklinisk)		*Wyeth, irreversibel, I/II NSCLC, bryst ** Boehringer Ingelheim, irreversibel, I/II prostata, eggstokk, bryst	*Pfizer, irreversibel, II NSCLC, bryst

Raf (H)	**SRC (H)**	**Mek: (I)**	**NFkB-IkB (I)**
Sorafenib PLX4032 (Plexxikon)	AZ	PD-325901 (II: NSCLC) AZD6244 – Array/Az XL518 Exelisis/DNA	

Raf (H)	**SRC (H)**	**Mek: (I)**	**NFkB-IkB (I)**
mTor (J)	**PI3K (J)**	**VEGFR2 og VEGFR1 (K)**	**VEGFR1/2/3:**
Rad 001: Everolimus* Temsirolimus** AP-23573***	PX-866*	Avastin (DNA) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171 (NSCLC, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)
*Everolimus (Novartis, kombinasjon med Gefetinib/Erlotinib, I/II: NSCLC, glioblastom) **Temsirolimus (Wyeth, kombinasjon med gefetinib/erlotinib, I/II: NSCLC, glioblastom) ***AP-23573 (Ariad, I/II: livmor)	*P110alfaspesifikk inhibering, ProIX Pharma, preklinisk NSCLC	* (PDL) anti-VEGFa **Regeneron/Aventis (reseptormimikk) (fase 2)	
VEGFR2-mål (L)			**EPH A-D**
DC101* IMC-IC11** IMC1121B, fullt humanisert CDP-791*** Pazopanib****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 (Eisai) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, PDGFR)	Bay-579352 (+ PDGFR) ABT-869* BMS-540215 (+FGFR1) KRN-951 BBIW	

Raf (H)	**SRC (H)**	**Mek: (I)**	**NFkB-IkB (I)**
*Imclone (fase 2/3?) **Kimært IgG1 mot VEGFR2 ***Celltech, pegylert di-Fab-antistoff mot R2 ****GSK, multippelt myelom, eggstokk, RCC fase 3-registrering fullført, sarkom II)	*OSI, PFIZER: (+ ErbB1 + PDGFR) (NSCLC, eggstokk fase 2) **Pfizer: VEGFR1,2 og PDGFRbeta) (RCC II) ***(VEGFR1,2 FGFR3,PDGFR)	*(+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)	

VEGFR 2/ErbB1/2 (ErbB1)/cMet/FGFR (M)	**VEGFR2/3/Raf/PDGFR /cKit/F It-3 (N)**	**TIE 1/2**	**VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit (O)**
ZD6474* XL647** AEE 788***	Sorafenib*		PTK787 (ikke cFMS, FLT-3) Sunitinib XL-999 SU-6668 (Pfizer) GSK AZ (AZD2171) BMS Novartis (AEE-788) Amgen Andre

*(vandetanib) (fase III: tyroid, NSCLC) **(Exelixis, også EPHB2): (Pasient resistent overfor erlotinib, asiatiske pasienter) (fase 2) ***(Novartis, fase1/2)	*(RCC, HCC, NSCLC(III), melanom(III))		
PDGFR-mål (P)	**Abl-mål: (Q)**	**FTL 3**	**RET**
Tandutinib Nilotinib	Imatinib Dasatinib Nilotinib AT-9283 AZD-0530 Bosutinib		

Kitmål (R)	**HGFR1/2**	**FGFR1-4**	**IGF-1R-mål (S)**
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron	Merck Pfizer Novartis
HSP90-inhibitorer:	**Antimitotiske legemidler:**	**Andre mål:**	
IPI-504* 17-AAG**	Docetaxel* Paklitaxel** Vinblastin, vinkristin, vinorelbin***	HDAC-inhibitorer BCL2 Kjemoterapi (nedbryting) Proteosom-inhibitorer	

Kitmål (R)	HGFR1/2	FGFR1-4	IGF-1R-mål (S)
*(Infinity Pharma, mutant ErbB1, I/II multippelt myelom, GIST) **(Kosan, I/II faste tumorer)	*(Mikrotubuli-stabilisator, adjuvant og fremskreden brystkreft, NSCLC, androgenuavhengig prostatakreft) **(Mikrotubuli-stabilisator, adjuvant og fremskreden brystkreft, NSCLC, eggstokkreft, AIDS-relatert Kaposi-sarkom) ***(Mikrotubuli-destabilisatorer)		

Den foreliggende oppfinnelsen anvender et adresserbart array med forbedret dynamisk område omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer fastholdt på et fast underlag, hvor innfangingsantistoffene i hver fortynningsserie er spesifikk for én eller flere analytter tilsvarende en komponent i en signaltransduksjonsvei og andre målproteiner. I forskjellige aspekter inkluderer dette arrayer som omfatter komponenter i signaltransduksjonsveier som er karakteristiske for særlige tumorer, f.eks. signaltransduksjonsveier som er aktive i brystkreftceller. Man kan således med fordel utføre oppfinnelsen hvor hvert signaltransduksjonsmolekyl eller et annet aktuelt protein med en potensiell ekspresjons- eller aktiveringsdefekt som forårsaker kreft, er representert på et enkelt array eller brikke. I noen aspekter er komponentene i en bestemt signaltransduksjonsvei som er aktiv i en særlig tumorcelle, anbrakt i en lineær sekvens som tilsvarer sekvensen hvor informasjon overføres gjennom en signaltransduksjonsvei innenfor en celle. Eksempler på slike arrayer er vist på figur 5–9. Innfangingsantistoffene som er spesifikke for én eller flere komponenter i en bestemt signaltransduksjonsvei

som er aktiv i en særlig tumorcelle, kan også være skrevet på en randomisert måte for å begrense eventuelle overflaterelaterte artefakter.

Ikke-begrensende eksempler på signaltransduksjonsveier som kan undersøkes ved hjelp av den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer dem vist i tabell 2.

Tabell 2

Signalvei 1	ErbB1	ErbB1-fosfo	ErbB1-Shc	ErbB1-ubiquitin	ErbB1-PI3K	PTEN		
Signalvei 2	ErbB1	ErbB1 VIII	ErbB1 VIII-fosfo	ErbB1 VIII-She	ErbB1 VIII-ubiquitin	ErbB1 VIII-PI3K	PTEN	
Signalvei 3	ErbB2	ErbB2-fosfo	HER-2-Shc	ErbB2: PI3K-kompleks	ErbB2-ubiquitin	PTEN		
Signalvei 4	ErbB2	P95-trunkert ErbB2	ErbB2-fosfo	P95-trunkert ERBB2-fosfo	HER-2-She	ERBB2: PI3K-kompleks	ErbB2-ubiquitin	P95ErbB2:PI3K
Signalvei 5	ErbB3	ErbB3-fosfo	ErbB3:PI3K-kompleks	ErbB3 PI3K-fosfo	ErbB3:Shc			
Signalvei 6	ErbB4	ErbB4-fosfo	ErbB4:Shc					
Signalvei 7	IGF-1R	IGF-1R-fosfo	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	Fosfo-IRS	IGF-1R:PI3K		
Signalvei 8	INSR	INSR-fosfo						
Signalvei 9	KIT	KIT-fosfo						
Signalvei 10	FLT3	FLT3-fosfo						
Signalvei 11	HGFR1	HGFR1-fosfo						
Signalvei 12	HGFR2	HGFR2-fosfo						
Signalvei 13	RET	RET-fosfo						
Signalvei 14	PDGFR alfa	PDGFR alfa-fosfo						

Signalvei 15	PDGFR beta	PDGFR beta-fosfo						
Signalvei 16	VEGFR1	VEGFR1-fosfo	VEGFR1: PLCγ-kompleks	VEGFR1: Src				
Signalvei 17	VEGFR2	VEGFR2-fosfo	VEGFR2: PLCγ-kompleks	VEGFR2: Src	VEGFR-2-heparinsulfat-kompleks	VEGFR-2-VE-kadherin-kompleks		
Signalvei 18	VEGFR3	VEGFR3-fosfo						
Signalvei 19	FGFR1	FGFR1-fosfo						
Signalvei 20	FGFR2	FGFR2-fosfo						
Signalvei 21	FGFR3	FGFR3-fosfo						
Signalvei 22	FGFR4	FGFR4-fosfo						
Signalvei 23	TIE1	TIE1-fosfo						
Signalvei 24	TIE2	TIE2-fosfo						
Signalvei 25	EPHA	EPHA-fosfo						
Signalvei 26	EPHB	EPHB-fosfo						
Signalvei 27	NFkB-IkB-kompleks	Fosfo-IκB (S32) Total IkB	Total NFκB fosfo-NFκB(S536)	Total P65 IkBa fosfo-P65 IkBa				

Signalvei 28	ER	Fosfo-ER	ER-AIB1	Andre ER-komplekser				
Signalvei 29	PR	Fosfo-Pr		PR-komplekser				
Signalvei 30	Hedgehog-signalvei							
Signalvei 31	Wnt-signalvei							
Signalvei 32	Notch-signalvei							
Signalvei 33	Total Mek fosfo-Mek (S217/S221)	Total Erk fosfo-Erk (T202/Y204)	Total Rsk-1 fosfo-Rsk-I (T357/S363)	Total Stat3 fosfo-Stat-3 (Y705) (S727) Total Stat I fosfo-Stat1 (Y701)	Fosfo-Bad (S112) Bad (total)	Total Fak fosfo-Fak (Y576)	Total cSrc fosfo-cSrc(Y416)	Total Ras fosfo-Ras
Signalvei 34	Akt (Total) fosfo-Akt (T473)	Fosfo-Akt (T308)	Fosfo-Bad (S112) Bad (total)	Fosfo-Bad (S136)	Bad:14-3-3-kompleks	Total mTor fosfo-mTor (S2448)	Total p70S6K fosfo-p70S6K (T229) (T389)	GSK3beta Total (fosfo-Ser 9)

Signalvei 35	Total Jnk fosfo-Jnk (T183/Y185)	Total P38 fosfo-P38 (T180/Y182)	Total Rb fosfo-Rb (S249/T252) fosfo-Rb (S780)	Total p53 fosfo-p53 (S392) fosfo-p53 (S20)	Fosfo-CREB(S133) Total CREB	Total c-Jun fosfo-c-Jun: (S63)	Total Paxillin fosfo-Paxillin (Y118)	
Signalvei 36	Ki67	Spaltet kaspase 3,8,9 andre	TOPO2					
Signalvei 37	TGF beta							

I visse utførelsesformer omfatter anticancer-legemiddelet et antisignaliseringsmiddel (dvs. et cytostatisk legemiddel) slik som et monoklonalt antistoff eller en tyrosinkinaseinhibitor, et antiproliferativt middel, et kjemoterapeutisk middel (f.eks. et cytotoksisk legemiddel), et terapeutisk hormonmiddel, et radioterapeutisk middel, en vaksine og/eller en hvilken som helst annen forbindelse med evne til å redusere eller oppheve den ukontrollerte veksten av unormale celler slik som kreftfremkallende celler. I noen utførelsesformer behandles de isolerte sirkulerende cellene med ett eller flere antisignaliseringsmidler, antiproliferative midler og/eller hormonelle terapeutiske midler i kombinasjon med minst ett kjemoterapeutisk middel.

Eksempler på antisignaliseringsmidler egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer blant annet monoklonale antistoffer slik som trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbitux®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab (Rituxan®) og tositumomab (BEXXAR®), tyrosinkinaseinhibitorer slik som gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW-572016, Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®), imatinibmesylat (Gleevec®), leflunomid (SU101) og vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474) og kombinasjoner derav.

Eksempler på antiproliferative midler inkluderer mTOR-inhibitorer slik som sirolimus (rapamycin), temsirolimus (CCI-779) og everolimus (RAD001), Akt-inhibitorer slik som 1L6-hydroksymetyl-kiro-inositol-2-(R)-2-O-metyl-3-O-oktadekyl-*sn*-glycerokarbonat, 9-metoksy-2-metylellipticiniumacetat, 1,3-dihydro-1-(1-((4-(6-fenyl-1H-imidazo[4,5-g]quinoksalin-7-yl)fenyl)metyl)-4-piperidinyl)-2H-benzimidazol-2-on, 10-(4'-(N-dietylamino)butyl)-2-klorfenoksazin, 3-formylkromontiosemikarbazon (Cu(II)Cl_2-kompleks), API-2, et 15-mert peptid avledet av aminosyre 10–24 av proto-onkogenet TCL1 (Hiromura et al., J. Biol. Chem., 279:53407–53418 (2004), KP372-1 og forbindelsene beskrevet i Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc., 125:1144–1145 (2003) og Kau et al., Cancer Cell, 4:463–476 (2003) og kombinasjoner derav.

Ikke-begrensende eksempler på kjemoterapeutiske midler inkluderer platinabaserte legemidler (f.eks. oksaliplatin, cisplatin, karboplatin, spiroplatin,

iproplatin, satraplatin osv.), alkylerende midler (f.eks. syklofosfamid, ifosfamid, klorambucil, busulfan, melfalan, mekloretamin, uramustin, tiotepa, nitrosourear osv.), antimetabolitter (f.eks. *5*-fluoruracil, azatioprin, 6-merkaptopurin, metotreksat, leukovorin, kapecitabin, cytarabin, floksuridin, fludarabin, gemcitabin (Gemzar®), pemetrexed (ALIMTA®), raltitrexed osv.), plantealkaloider (f.eks. vinkristin, vinblastin, vinorelbin, vindesin, podofyllotoksin, paklitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®) osv.), topoisomeraseinhibitorer (f.eks. irinotecan, topotecan, amsakrin, etoposid (VP16), etoposidfosfat, teniposid osv.), tumordrepende antibiotika (f.eks. doksorubicin, adriamycin, daunorubicin, epirubicin, aktinomucin, bleomycin, mitomycin, mitoksantron, plicamycin osv.), farmasøytisk akseptable salter derav, stereoisomerer derav, derivater derav, analoger derav og kombinasjoner derav.

Eksempler på hormonelle terapeutiske midler inkluderer blant annet aromataseinhibitorer (f.eks. aminoglutetimid, anastrozol (Arimidex®), letrozol (Femara®), vorozol, eksemestan (Aromasin®), 4-androsten-3,6,17-trion (6-okso), 1,4,6-androstatrien-3,17-dion (ATD), formestan (Lentaron®) osv.), selektive østrogenreseptormodulatorer (f.eks. bazedoksifen, klomifen, fulvestrant, lasofoksifen, raloksifen, tamoksifen, toremifen osv.), steroider (f.eks. deksametason), finasterid og gonadotropinfrisettende hormonagonister (GnRH) slik som goserelin, farmasøytisk akseptable salter derav, stereoisomerer derav, derivater derav, analoger derav og kombinasjoner derav.

Ikke-begrensende eksempler på kreftvaksiner som er nyttige for den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer ANYARA fra Active Biotech, DCVax-LB fra Northwest Biotherapeutics, EP-2101 fra IDM Pharma, GV1001 fra Pharmexa, IO-2055 fra Idera Pharmaceuticals, INGN 225 fra Introgen Therapeutics og Stimuvax fra Biomira/Merck.

Eksempler på radioterapeutiske midler inkluderer blant annet radionuklider slik som ^{47}Sc, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{89}Sr, ^{86}Y, ^{87}Y, ^{90}Y, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{111}In, ^{117m}Sn, ^{149}Pm, ^{153}Sm ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{211}At og ^{212}Bi, eventuelt konjugert til antistoffer rettet mot tumorantigener.

I noen utførelsesformer omfatter hver fortynningsserie av innfangingsantistoffer en serie av reduserende innfangingsantistoffkonsentrasjoner. I visse tilfeller fortynnes innfangingsantistoffene serielt minst 2 ganger (f.eks. 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 eller 1000 ganger) for å produsere en fortynningsserie omfattende et fastsatt antall (f.eks. minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 eller 25) av reduserende innfangingsantistoffkonsentrasjoner som spottes på arrayet. Minst 2, 3, 4, 5 eller 6 replikasjoner av hver innfangingsantistoffortynning spottes foretrukket på arrayet.

I andre utførelsesformer omfatter det faste underlaget glass (f.eks. en glassplate), plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membran (f.eks. nylon, nitrocellulose, polyvinylidenfluorid (PVDF) osv.), fiberbunter eller et hvilket som helst annet egnet substrat. I en foretrukket utførelsesform fastholdes innfangingsantistoffene (f.eks. via kovalente eller ikke-kovalente interaksjoner) på glassplater overtrukket med en nitrocellulosepolymer slik som for eksempel FAST®-plater, som er kommersielt tilgjengelige fra Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

I noen utførelsesformer omfatter den cellulære ekstrakten en ekstrakt av sirkulerende celler i en fast brysttumor. De sirkulerende cellene isoleres typisk fra en pasientprøve ved hjelp av én eller flere separasjonsfremgangsmåter som er kjent i teknikken, herunder for eksempel immunmagnetisk separasjon, CellTracks®-systemet, mikrofluidisk separasjon, FACS, densitetgradientsentrifugering og nedbrytingsfremgangsmåter.

I andre utførelsesformer omfatter pasientprøven en kroppsvæskeprøve slik som for eksempel en prøve av fullblod, serum, plasma, duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe, benmargsaspirat, urin, saliva og/eller finnålsaspirat. I visse tilfeller separeres fullblodsprøven til en plasma- eller serumfraksjon og en cellulær fraksjon (dvs. cellepellet). Den cellulære fraksjonen inneholder typisk røde blodceller, hvite blodceller og/eller sirkulerende celler i en fast brysttumor slik som CTC-er, CEC-er, CEPC-er, disseminerte tumorceller i lymfeknuten og/eller CSC-er. Plasma- eller serumfraksjonen inneholder vanligvis blant annet nukleinsyrer (f.eks. DNA, RNA) og proteiner som frisettes av sirkulerende celler i en fast tumor.

I noen tilfeller kan de isolerte sirkulerende cellene stimuleres *in vitro* med én eller flere vekstfaktorer før, under og/eller etter inkubering med én eller flere aktuelle anticancer-legemidler. Stimulerende vekstfaktorer er beskrevet ovenfor. I andre tilfeller kan de isolerte sirkulerende cellene lyseres, f.eks. etter vekstfaktorstimulering og/eller behandling med anticancer-legemiddel, for å produsere den cellulære ekstrakten (f.eks. cellelysat) ved hjelp av en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken. Cellelyseringen initieres foretrukket mellom cirka 1 og 360 minutter etter vekstfaktorstimulering, og mer foretrukket ved to forskjellige tidsintervaller: (1) cirka 1–5 minutter etter vekstfaktorstimulering og (2) mellom cirka 30 og 180 minutter etter vekstfaktorstimulering. Cellelysatet kan alternativt oppbevares ved -80 °C frem til anvendelse.

I foretrukne utførelsesformer detekteres ekspresjon og/eller aktiveringsstatus for et flertall av signaltransduksjonsmolekylene i tumorceller slik som sirkulerende celler i den faste tumoren ved hjelp av et enkeltdeteksjons- eller proksimitetsdeteksjonsassay som beskrevet nedenfor.

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte ifølge krav 1 for valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor, idet fremgangsmåten omfatter:
(a) lysering av celler i en brysttumor etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt,
(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og
(c) bestemmelse av hvorvidt anticancer-legemiddelet er egnet eller uegnet til behandling av brysttumoren ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I visse tilfeller kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (c) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I visse andre tilfeller kan fremgangsmåtene

ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (c) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 1 for valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor:
(a) lysering av celler i en brysttumor etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt,
(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,
(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og
(d) angivelse av at anticancer-legemiddelet er egnet til behandling av brysttumoren når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte, dvs. som trinn (e), eller alternativt omfatte, dvs. som trinn (d), trinnet for angivelse av at anticancer-legemiddelet er uegnet for behandling av brysttumoren når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene ikke er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (d) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I enda andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (d) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

I noen utførelsesformer anses aktiveringsstatus for en analytt slik som et signaltransduksjonsmolekyl for å være "vesentlig redusert" under nærvær av et anticancer-legemiddel når det er minst cirka 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %,

75 %, 80 %, 85 %, 90 % eller 95 % mindre aktivert enn under fravær av anticancer-legemiddelet. I andre utførelsesformer anses aktiveringsstatus for en analytt slik som et signaltransduksjonsmolekyl for å være "vesentlig redusert" under nærvær av et anticancer-legemiddel (1) når det er en endring fra høy eller sterk aktivering av analytten uten anticancer-legemiddelet til middels, svak, lav eller svært svak aktivering av analytten med anticancer-legemiddelet, eller (2) når det er en endring fra middels aktivering av analytten uten anticancer-legemiddelet til svak, lav eller svært svak aktivering av analytten med anticancer-legemiddelet.

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen utføres etter trinnet for oppnåelse av en prøve fra en pasient med en brysttumor hvorfra celler i en brysttumor er isolert. Prøven kan oppnås fra en brystkreftpasient enten før behandling med anticancer-legemiddel (f.eks. før inkubering med et anticancer-legemiddel) eller etter administrering av et anticancer-legemiddel (f.eks. på et hvilket som helst tidspunkt gjennom hele kreftbehandlingen). Egnede prøver inkluderer blant annet fullblod, serum, plasma, duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe, benmargsaspirat, urin, saliva, finnålsaspirat (FNA) og kombinasjoner derav. I én foretrukket utførelsesform er prøven en prøve av fullblod eller FNA. I denne utførelsesformen kan sirkulerende celler i en brysttumor isoleres fra fullblodsprøve, eller brystkreftcellene kan isoleres fra FNA-prøven. Hvis isolerte celler oppnås fra en pasient som ikke har mottatt behandling med et anticancer-legemiddel, kan de isolerte cellene inkuberes *in vitro* under egnede betingelser med ett eller en blanding av anticancer-legemidler som retter seg mot én eller flere analyttene som skal detekteres i trinn (b).

Sirkulerende celler i en brysttumor kan isoleres fra en prøve ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken, f.eks. ved immunmagnetisk separasjon, CellTracks®-systemet, mikrofluidisk separasjon, FACS, densitetgradientsentrifugering og nedbrytingsfremgangsmåter (se eksempel 1). Eksempler på sirkulerende celler som kan isoleres fra en prøve, inkluderer blant annet sirkulerende tumorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende endoteliale progenitorceller, kreftstamceller, disseminerte tumorceller og kombinasjoner derav. Det kan lyseres isolerte celler slik som sirkulerende celler

for derved å transformere de isolerte cellene til en cellulær ekstrakt ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken (se eksempel 1).

I én utførelsesform er brysttumoren avledet fra en pasient med duktalt karsinom eller lobulært karsinom. Eksempler på duktale karsinomer inkluderer blant annet invasivt duktalt karsinom og duktalt karsinom in situ. Ikke-begrensende eksempler på lobulære karsinomer inkluderer invasivt lobulært karsinom eller lobulært karsinom in situ.

I visse tilfeller isoleres cellene i en brysttumor fra tumorvev. Tumorvevet kan være f.eks. primærtumorvev eller metastatisk tumorvev. I en foretrukket utførelsesform isoleres cellene fra tumorvev som en prøve av finnålsaspirat (FNA).

I noen utførelsesformer stimuleres de isolerte cellene *in vitro* med vekstfaktorer som beskrevet heri. I andre utførelsesformer kan anticancer-legemiddelet omfatte én eller flere de terapeutiske midlene beskrevet heri, herunder blant annet monoklonale antistoffer, tyrosinkinaseinhibitorer, kjemoterapeutiske midler, terapeutiske hormonmidler, radioterapeutiske midler og vaksiner.

I foretrukne utførelsesformer omfatter den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten et flertall av signaltransduksjonsmolekyler. Eksempler på signaltransduksjonsmolekyler inkluderer blant annet reseptortyrosinkinaser, ikke-reseptortyrosinkinaser, tyrosinkinasesignaliseringskaskadekomponenter, nukleære hormonreseptorer, nukleære reseptorkoaktivatorer, nukleære reseptorrepressorer og kombinasjoner derav. I visse tilfeller er flertallet av signaltransduksjonsmolekylene valgt fra gruppen bestående av EGFR (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 og kombinasjoner derav. Flertallet av signaltransduksjonsmolekyler er foretrukket valgt fra gruppen bestående av ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, ER, PR og kombinasjoner derav.

I noen utførelsesformer kan aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten være f.eks. en fosforyleringsstatus, en ubiquineringsstatus, en komplekseringsstatus eller kombinasjoner derav. I andre utførelsesformer kan det faste underlaget omfatte f.eks. glass, plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membran, fiberbunter og kombinasjoner derav. I enda andre utførelsesformer fastholdes innfangingsantistoffene på det faste underlaget i et adresserbart array.

Assayet i trinn (b) omfatter:
(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),
(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og aktiveringsstatusavhengige antistoffene),
(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med første og andre medlemmer av et signalamplifikasjonspar for å generere et amplifisert signal, og
(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusavhengige antistoffene omfatter et første medlem av et bindingspar (f.eks. biotin). I noen tilfeller omfatter det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet (f.eks. en peroksidase slik som HRP) et andre medlem av bindingsparet (f.eks. streptavidin). I visse tilfeller kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens (f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere en aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på

signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som f.eks. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

Assayet i trinn (b) omfatter:
(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),
(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med deteksjonsantistoffer omfattende et flertall av aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og et flertall av aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og deteksjonsantistoffer),
hvor de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene merkes med glykoseoksidase, en tilretteleggingsenhet, de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar, og tilretteleggingsenheten glykoseoksidase genererer et oksideringsmiddel som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet,
(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med et andre medlem av signalamplifikasjonsparet for å generere et amplifisert signal,
og
(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusuavhengige antistoffene kan merkes direkte med tilretteleggingsenheten glykoseoksidase eller merkes indirekte med tilretteleggingsenheten, f.eks. via hybridisering mellom et oligonukleotid konjugert til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene og et komplementært oligonukleotid konjugert til tilretteleggingsenheten. De aktiveringsstatusavhengige antistoffene kan likeledes merkes direkte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet eller merkes indirekte med det

første medlemmet av signalamplifikasjonsparet, f.eks. via binding mellom et første medlem av et bindingspar konjugert til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene og et andre medlem av bindingsparet konjugert til det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet. I visse tilfeller er det første medlemmet av bindingsparet biotin, og det andre medlemmet av bindingsparet er et avidin slik som streptavidin eller neutravidin.

Tilretteleggingsenheten er glukoseoksidase. I visse tilfeller kan glukoseoksidasen og de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl som beskrevet for eksempel i eksempel 16 og 17. Det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 500 kDa (f.eks. cirka 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 eller 750 kDa). I andre utførelsesformer kan oksideringsmiddelet være for eksempel hydrogenperoksid (H_2O_2). I enda andre utførelsesformer kan det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel en peroksidase slik som pepperrotperoksidase (HRP). I ytterligere utførelsesformer kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens (f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere en aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som f.eks. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

I visse tilfeller kan pepperrotperoksidasen og de aktiveringsstatusavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl. Det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 70 kDa (f.eks. cirka 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 kDa).

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for forbedring av valget av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 2 for identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel, idet fremgangsmåten omfatter:

(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og

(c) identifikasjon av brysttumoren som responsiv eller ikke-responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I visse tilfeller kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (c) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I visse andre tilfeller kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (c) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 2 for identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel:

(a) lysering av celler i en brysttumor isolert etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel, for å produsere en cellulær ekstrakt,

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,

(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og

(d) angivelse av at brysttumoren er responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte, dvs. som trinn (e), eller alternativt omfatte, dvs. som trinn (d), trinnet for angivelse av at brysttumoren er ikke-responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene ikke er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (d) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I enda andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (d) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

Aktiveringsstatus for en analytt (f.eks. et signaltransduksjonsmolekyl) kan være "vesentlig redusert" under nærvær av et anticancer-legemiddel som beskrevet ovenfor. I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene beskrevet heri utføres etter trinnet for oppnåelse av en prøve fra en pasient med en brysttumor hvorfra brystkreftceller isoleres. Prøven kan oppnås fra en brystkreftpasient enten før behandling med anticancer-legemiddel (f.eks. før inkubering med et anticancer-legemiddel) eller etter administrering av et anticancer-legemiddel (f.eks. på et hvilket som helst tidspunkt gjennom hele kreftbehandlingen). Egnede prøver inkluderer blant annet fullblod, serum, plasma, duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe, benmargsaspirat, urin, saliva, finnålsaspirat (FNA) og kombinasjoner derav. I én foretrukket utførelsesform er prøven en prøve av fullblod eller FNA. I denne utførelsesformen kan sirkulerende celler i en brysttumor isoleres fra fullblodsprøve, eller brystkreftcellene kan isoleres fra FNA-prøven. Hvis isolerte celler oppnås fra en pasient som ikke har mottatt behandling med et anticancer-legemiddel, kan de isolerte cellene inkuberes *in vitro* under egnede betingelser med ett eller en blanding av anticancer-legemidler som retter seg mot én eller flere analytter som skal detekteres i trinn (b).

Sirkulerende celler i en brysttumor kan isoleres fra en prøve ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken, f.eks. ved immunmagnetisk separasjon, CellTracks®-systemet, mikrofluidisk separasjon, FACS, densitetgradientsentrifugering og nedbrytingsfremgangsmåter (se eksempel 1). Eksempler på sirkulerende celler som kan isoleres fra en prøve, inkluderer blant annet sirkulerende tumorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende endoteliale progenitorceller, kreftstamceller, disseminerte tumorceller og kombinasjoner derav. Det kan lyseres isolerte celler slik som sirkulerende celler for derved å transformere de isolerte cellene til en cellulær ekstrakt ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken (se eksempel 1).

I noen utførelsesformer er brysttumoren avledet fra en pasient med duktalt karsinom eller lobulært karsinom. Eksempler på duktale karsinomer inkluderer blant annet invasivt duktalt karsinom og duktalt karsinom in situ. Ikke-begrensende eksempler på lobulære karsinomer inkluderer invasivt lobulært karsinom eller lobulært karsinom in situ.

I visse tilfeller isoleres cellene i en brysttumor fra tumorvev. Tumorvevet kan være for eksempel primærtumorvev eller metastatisk tumorvev. I en foretrukket utførelsesform isoleres cellene fra tumorvev som en prøve av finnålsaspirat (FNA).

I noen utførelsesformer stimuleres de isolerte cellene *in vitro* med vekstfaktorer som beskrevet heri. I andre utførelsesformer kan anticancer-legemiddelet omfatte ett eller flere av de terapeutiske midlene beskrevet heri, herunder blant annet monoklonale antistoffer, tyrosinkinaseinhibitorer, kjemoterapeutiske midler, terapeutiske hormonmidler, radioterapeutiske midler og vaksiner.

I foretrukne utførelsesformer omfatter den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten et flertall av signaltransduksjonsmolekyler. Eksempler på signaltransduksjonsmolekyler inkluderer blant annet reseptortyrosinkinaser, ikke-reseptortyrosinkinaser, tyrosinkinasesignaliseringskaskadekomponenter, nukleære hormonreseptorer, nukleære reseptorkoaktivatorer, nukleære reseptorrepressorer og kombinasjoner derav. I visse tilfeller er flertallet av signaltransduksjonsmolekylene valgt fra gruppen bestående av EGFR (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-

IkB, mTor, PI3K, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 og kombinasjoner derav. Flertallet av signaltransduksjonsmolekylene er foretrukket valgt fra gruppen bestående av ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, ER, PR og kombinasjoner derav.

I noen utførelsesformer kan aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten være for eksempel en fosforyleringsstatus, en ubiquineringsstatus, en komplekseringsstatus eller kombinasjoner derav. I andre utførelsesformer kan det faste underlaget omfatte for eksempel glass, plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membran, fiberbunter og kombinasjoner derav. I enda andre utførelsesformer fastholdes innfangingsantistoffene på det faste underlaget i et adresserbart array.

Assayet i trinn (b) omfatter:
(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),
(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og aktiveringsstatusavhengige antistoffene),
(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med første og andre medlemmer av et signalamplifikasjonspar for å generere et amplifisert signal, og
(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusavhengige antistoffene omfatter et første medlem av et bindingspar (f.eks. biotin). I noen tilfeller omfatter det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet (f.eks. en peroksidase slik som HRP) et andre medlem

av bindingsparet (f.eks. streptavidin). I visse tilfeller kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens (f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere et aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som f.eks. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

Assayet i trinn (b) omfatter:

(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),

(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med deteksjonsantistoffer omfattende et flertall av aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og et flertall av aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og deteksjonsantistoffer),

hvor de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene merkes med glukoseoksidase, en tilretteleggingsenhet, de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar, og tilretteleggingsenheten glukoseoksidase genererer et oksideringsmiddel som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet,

(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med et andre medlem av signalamplifikasjonsparet for å generere et amplifisert signal,

og

(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusuavhengige antistoffene kan merkes direkte med tilretteleggingsenheten glukoseoksidase eller merkes indirekte med tilretteleggingsenheten, f.eks. via hybridisering mellom et oligonukleotid konjugert til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene og et komplementært oligonukleotid konjugert til tilretteleggingsenheten. De aktiveringsstatusavhengige antistoffene kan likeledes merkes direkte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet eller merkes indirekte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet, f.eks. via binding mellom et første medlem av et bindingspar konjugert til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene og et andre medlem av bindingsparet konjugert til det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet. I visse tilfeller er det første medlemmet av bindingsparet biotin, og det andre medlemmet av bindingsparet er et avidin slik som streptavidin eller neutravidin.

Tilretteleggingsenheten er glukoseoksidase. I visse tilfeller kan glukoseoksidasen og de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl som beskrevet for eksempel i eksempel 16 og 17. Det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 500 kDa (f.eks. cirka 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 eller 750 kDa). I andre utførelsesformer kan oksideringsmiddelet være for eksempel hydrogenperoksid (H_2O_2). I enda andre utførelsesformer kan det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel en peroksidase slik som pepperrotperoksidase (HRP). I ytterligere utførelsesformer kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens (f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere et aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som f.eks. 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

I visse tilfeller kan pepperrotperoksidasen og de aktiveringsstatusavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl. Det

sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 70 kDa (f.eks. cirka 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 kDa).

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for forbedring av identifikasjonen av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel.

I enda et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte ifølge krav 3 for prediksjon av en respons til pasient med en brysttumor på behandling med et anticancer-legemiddel, idet fremgangsmåten omfatter:
(a) lysering av celler i en brysttumor som isoleres etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt,
(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og
(c) prediksjon av sannsynligheten for at pasienten vil respondere på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet.

I visse tilfeller kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (c) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I visse andre tilfeller kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (c) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten ifølge krav 3 for prediksjon av responsen til en pasient med en brysttumor på behandling med et anticancer-legemiddel:

(a) lysering av celler i en brysttumor etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel,
for å produsere en cellulær ekstrakt,
(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag,
(c) sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, og
(d) angivelse av at pasienten sannsynligvis vil respondere på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte, dvs. som trinn (e), eller alternativt omfatte, dvs. som trinn (d), trinnet for angivelse av at pasienten sannsynligvis ikke vil respondere (f.eks. ha en usannsynlig mulighet eller lav sannsynlighet for å respondere) på behandling med anticancer-legemiddelet når aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene ikke er vesentlig redusert sammenlignet med referanseaktiveringsprofilen.

I visse andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte sending eller rapportering av resultatene fra trinn (d) til en lege, f.eks. en onkolog eller en allmennlege. I enda andre tilfeller kan den foretrukne utførelsesformen videre omfatte registrering eller lagring av resultatene fra trinn (d) i en database eller en annen egnet maskin eller anordning for lagring av informasjon, f.eks. ved et laboratorium.

Aktiveringsstatus for en analytt (f.eks. et signaltransduksjonsmolekyl) kan være "vesentlig redusert" under nærvær av et anticancer-legemiddel som beskrevet ovenfor. I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene beskrevet heri videre omfatte trinnet for oppnåelse av en prøve fra en pasient med en brysttumor hvorfra brystkreftceller isoleres. Prøven kan oppnås fra en brystkreftpasient enten før behandling med anticancer-legemiddel (f.eks. før inkubering med et anticancer-legemiddel) eller etter administrering av et anticancer-legemiddel (f.eks. på et hvilket som helst tidspunkt gjennom hele kreftbehandlingen).

Egnede prøver inkluderer blant annet fullblod, serum, plasma, duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe, benmargsaspirat, urin, saliva, finnålsaspirat (FNA) og kombinasjoner derav. I én foretrukket utførelsesform er prøven en prøve av fullblod eller FNA. I denne utførelsesformen kan sirkulerende celler i en brysttumor isoleres fra fullblodsprøve, eller brystkreftcellene kan isoleres fra FNA-prøven. Hvis isolerte celler oppnås fra en pasient som ikke har mottatt behandling med et anticancer-legemiddel, kan de isolerte cellene inkuberes *in vitro* under egnede betingelser med ett eller en blanding av anticancer-legemidler som retter seg mot én eller flere analytter som skal detekteres i trinn (c).

Sirkulerende celler i en brysttumor kan isoleres fra en prøve ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken, f.eks. ved immunmagnetisk separasjon, CellTracks®-systemet, mikrofluidisk separasjon, FACS, densitetgradientsentrifugering og nedbrytingsfremgangsmåter (se eksempel 1). Eksempler på sirkulerende celler som kan isoleres fra en prøve, inkluderer blant annet sirkulerende tumorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende endoteliale progenitorceller, kreftstamceller, disseminerte tumorceller og kombinasjoner derav. Det kan lyseres isolerte celler slik som sirkulerende celler for derved å transformere de isolerte cellene til en cellulær ekstrakt ved en hvilken som helst teknikk som er kjent i teknikken (se eksempel 1).

I noen utførelsesformer er brysttumoren avledet fra en pasient med duktalt karsinom eller lobulært karsinom. Eksempler på duktale karsinomer inkluderer blant annet invasivt duktalt karsinom og duktalt karsinom in situ. Ikke-begrensende eksempler på lobulære karsinomer inkluderer invasivt lobulært karsinom eller lobulært karsinom in situ.

I visse tilfeller isoleres cellene i en brysttumor fra tumorvev. Tumorvevet kan være for eksempel primærtumorvev eller metastatisk tumorvev. I en foretrukket utførelsesform isoleres cellene fra tumorvev som en prøve av finnålsaspirat (FNA).

I noen utførelsesformer stimuleres de isolerte cellene *in vitro* med vekstfaktorer som beskrevet heri. I andre utførelsesformer kan anticancer-legemiddelet omfatte ett eller flere av de terapeutiske midlene beskrevet heri, herunder blant

annet monoklonale antistoffer, tyrosinkinaseinhibitorer, kjemoterapeutiske midler, terapeutiske hormonmidler, radioterapeutiske midler og vaksiner.

I foretrukne utførelsesformer omfatter den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten et flertall av signaltransduksjonsmolekyler. Eksempler på signaltransduksjonsmolekyler inkluderer blant annet reseptortyrosinkinaser, ikke-reseptortyrosinkinaser, tyrosinkinasesignaliseringskaskadekomponenter, nukleære hormonreseptorer, nukleære reseptorkoaktivatorer, nukleære reseptorrepressorer og kombinasjoner derav. I visse tilfeller er flertallet av signaltransduksjonsmolekylene valgt fra gruppen bestående av EGFR (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 og kombinasjoner derav. Flertallet av signaltransduksjonsmolekyler er foretrukket valgt fra gruppen bestående av ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, ER, PR og kombinasjoner derav.

I noen utførelsesformer kan aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene i den cellulære ekstrakten være for eksempel en fosforyleringsstatus, en ubiquineringsstatus, en komplekseringsstatus eller kombinasjoner derav. I andre utførelsesformer kan det faste underlaget omfatte f.eks. glass, plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membran, fiberbunter og kombinasjoner derav. I enda andre utførelsesformer fastholdes innfangingsantistoffene på det faste underlaget i et adresserbart array.

Assayet i trinn (b) omfatter:
(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),
(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av

detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og aktiveringsstatusavhengige antistoffene),
(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med første og andre medlemmer av et signalamplifikasjonspar for å generere et amplifisert signal, og
(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusavhengige antistoffene omfatter et første medlem av et bindingspar (f.eks. biotin). I noen tilfeller omfatter det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet (f.eks. en peroksidase slik som HRP) et andre medlem av bindingsparet (f.eks. streptavidin). I visse tilfeller kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens (f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere et aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som for eksempel 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

Assayet i trinn (b) omfatter:
(i) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsserier av innfangingsantistoffene for å danne et flertall av innfangne analytter (f.eks. for å transformere analyttene i den cellulære ekstrakten til komplekser av innfangne analytter omfattende analyttene og innfangingsantistoffene),
(ii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av innfangne analytter med deteksjonsantistoffer omfattende et flertall av aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og et flertall av aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter (f.eks. for å transformere kompleksene av innfangne analytter til komplekser av detekterbare innfangne analytter omfattende de innfangne analyttene og deteksjonsantistoffer),

hvor de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene merkes med glukoseoksidase, en tilretteleggingsenhet, de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar, og tilretteleggingsenheten glukoseoksidase genererer et oksideringsmiddel som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet,

(iii) inkubering (f.eks. opprettelse av kontakt) av flertallet av detekterbare innfangne analytter med et andre medlem av signalamplifikasjonsparet for å generere et amplifisert signal,

og

(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

De aktiveringsstatusuavhengige antistoffene kan merkes direkte med tilretteleggingsenheten glukoseoksidase eller merkes indirekte med tilretteleggingsenheten, f.eks. via hybridisering mellom et oligonukleotid konjugert til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene og et komplementært oligonukleotid konjugert til tilretteleggingsenheten. De aktiveringsstatusavhengige antistoffene kan likeledes merkes direkte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet eller merkes indirekte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet, f.eks. via binding mellom et første medlem av et bindingspar konjugert til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene og et andre medlem av bindingsparet konjugert til det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet. I visse tilfeller er det første medlemmet av bindingsparet biotin, og det andre medlemmet av bindingsparet er et avidin slik som streptavidin eller neutravidin.

Tilretteleggingsenheten er glukoseoksidase. I visse tilfeller kan glukoseoksidasen og de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl som beskrevet i for eksempel eksempel 16 og 17. Det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 500 kDa (f.eks. cirka 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 eller 750 kDa). I andre utførelsesformer kan oksideringsmiddelet være for eksempel hydrogenperoksid (H_2O_2). I enda andre utførelsesformer kan det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel en peroksidase slik som pepperrotperoksidase (HRP). I ytterligere utførelsesformer kan det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet være for eksempel et tyramidreagens

(f.eks. biotintyramid). Det amplifiserte signalet genereres foretrukket ved peroksidaseoksidering av biotintyramid for å produsere et aktivert tyramid (f.eks. for å transformere biotintyramidet til et aktivert tyramid). Det aktiverte tyramidet kan detekteres direkte eller indirekte, f.eks. ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens. Ikke-begrensende eksempler på signaldeteksjonsreagenser inkluderer streptavidinmerkede fluoroforer og kombinasjoner av streptavidinmerkede peroksidaser og kromogene reagenser slik som for eksempel 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

I visse tilfeller kan pepperrotperoksidasen og de aktiveringsstatusavhengige antistoffene være konjugert til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl. Det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har typisk en molekylvekt på cirka 70 kDa (f.eks. cirka 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 kDa).

I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttige for hjelp til prediksjon av en pasients sannsynlighet for å respondere på behandling med et anticancer-legemiddel. I andre utførelsesformer kan fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen være nyttig for forbedring av prediksjonen av en pasients sannsynlighet for å respondere på behandling med et anticancer-legemiddel.

I et ytterligere aspekt anvender den foreliggende oppfinnelsen et array med forbedret dynamisk område omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer fastholdt på et fast underlag, hvor innfangingsantistoffene i hver fortynningsserie er spesifikke for én eller flere analytter tilsvarende en komponent i en signaltransduksjonsvei eller et annet protein (f.eks. nukleær hormonreseptor) i en cellulær ekstrakt.

I visse utførelsesformer kan signaltransduksjonsveien være involvert i cellespredning. I slike utførelsesformer kan innfangingsantistoffene omfatte for eksempel ett eller flere medlemmer valgt fra gruppen bestående av antistoffer som er reaktive med IGFIR, cMET, ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, p70S6K, ER, PR, NCOR og AIB1. I visse andre utførelsesformer kan signaltransduksjonsveien være involvert i tumorangiogenese. I slike utførelsesformer kan innfangingsantistoffene omfatte for eksempel ett eller flere medlemmer valgt fra gruppen bestående av

antistoffer som er reaktive med Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, p70S6K, VEGFR-1, VEGFR-2, Tie 2, V-kadherin-R2-kompleks, PDGFRA og PDGFRB. De adresserbare arrayene beskrevet heri er således særlig nyttige for bestemmelse av ekspresjonen og/eller aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler og andre proteiner som er involvert i brystkreft.

IV. Brystkreft

Brystkreft er den femte vanligste årsaken til dødsfall på grunn av kreft i verden, etter lungekreft, magekreft, leverkreft og tykktarmkreft. I 2005 forårsaket brystkreft 502 000 dødsfall på verdensbasis. Blant kvinner i verden er brystkreft den vanligste årsaken til dødsfall på grunn av kreft.

I USA er brystkreft den tredje vanligste årsaken til dødsfall på grunn av kreft, etter lungekreft og tykktarmkreft. I 2007 forårsaket brystkreft over 40 000 dødsfall i USA. Blant kvinner i USA er brystkreft den vanligste krefttypen og den nest vanligste årsaken til dødsfall på grunn av kreft. Kvinner i USA har faktisk en 1/8 risiko for å utvikle invasiv brystkreft i løpet av livet og en 1/33 risiko for å dø av brystkreft.

Antallet tilfeller av brystkreft i verden har økt vesentlig siden 1970-årene, et fenomen som delvis tilskrives den modeme livsstilen i Vesten. Siden brystet er sammensatt av identisk vev hos menn og kvinner, forekommer brystkreft også hos menn, men det er mindre vanlig.

Klassifisering

Brystkreft kan beskrives ved hjelp av fire forskjellige klassifiseringssystemer, hver basert på følgende kriterier:

1. Patologi. Patologen kan kategorisere hver tumor basert på det histologiske utseende og andre kriterier. De vanligste patologiske typene av brystkreft er invasivt duktalt karsinom og invasivt lobulært karsinom.

2. Tumorgrad. Patologen kan bestemme den histologiske graden under et mikroskop. En veldifferensiert (lavgradig) tumor ligner normalt vev. En dårlig differensiert (høygradig) tumor er sammensatt av desorganiserte celler og ligner

ikke normalt vev. Moderat differensierte (mellomgradige) tumorer ligger et sted midt imellom.

3. Protein- og genekspresjonsstatus. Brystkreft kan testes for ekspresjon og/eller aktivering av signaltransduksjonsmolekyler slik som for eksempel østrogenreseptoren (ER), progesteronreseptoren (PR) og Her2/Neu/ErbB2. Som beskrevet heri bidrar ekspresjonsprofilen for en bestemt tumor til prediksjon av prognosen og hjelper onkologen med å velge den mest egnede behandlingen.

4. Tumorstadium. Brystkreft kan stadieinndeles ifølge TNM-klassifiseringssystemet:

a. Tumor. Fem verdier (Tis, T1, T2, T3 eller T4) avhengig av forekomst eller fravær av invasiv kreft, den invasive kreftens dimensjoner og forekomst eller fravær av invasjon utenfor brystet (f.eks. til huden på brystet eller muskelen eller ribbena under).

b. Lymfeknute. Fire verdier (N0, N 1, N2 eller N3) avhengig av de metastatiske avsetningenes antall, størrelse og lokalisering i lymfeknutene.

c. Metastaser. To verdier (M0 eller M 1) avhengig av forekomst eller fravær av andre metastaser enn lymfeknuter (såkalte fjerntliggende metastaser, f.eks. til ben, hjerne, lunge osv.).

<u>Patologi</u>

Med hensyn til patologi angir Verdens helseorganisasjons klassifisering av brysttumorer følgende histologiske typer:

1. Invasive brystkarsinomer slik som invasivt duktalt karsinom (f.eks. basallignende karsinom, blandet karsinom, pleomorft karsinom, karsinom med osteoklastiske kjempeceller, karsinom med koriokarsinome trekk, karsinom med melanotiske trekk), invasivt lobulært karsinom, tubulært karsinom, invasivt kribriformt karsinom, medullært karsinom, mucinøst karsinom og andre tumorer med abundant mucin (f.eks. mucinøst karsinom, cystadenokarsinom og mucinøst kolonnecellekarsinom, signetringcellekarsinom), nevroendokrine tumorer (f.eks. fast nevroendokrint karsinom (karsinoid i brystet), atypisk karsinoidtumor, småcellet karsinom, storcellet nevroendokrint karsinom), invasivt papillært karsinom, invasivt mikropapillært karsinom, apokrint karsinom, metaplastiske karsinomer (f.eks. blandede epiteliale/mesenkymale metaplastiske karsinomer eller rene epiteliale metaplastiske karsinomer slik som skvamøst cellekarsinom, adenokarsinom med spindelcellemetaplasi, adenoskvamøst karsinom og

mukoepidermoid karsinom), lipidrikt karsinom, sekretorisk karsinom, onkocyttisk karsinom, adenoid cystisk karsinom, acinærcellekarsinom, glykogenrikt klarcellet karsinom, sebacøst karsinom, inflammatorisk karsinom og bilateralt brystkarsinom;

2. Forløperlesjoner slik som lobulær neoplasi (f.eks. lobulært karsinom in situ), intraduktale proliferative lesjoner (f.eks. vanlig duktal hyperplasi, flat epitelial hyperplasi, atypisk duktal hyperplasi, duktalt karsinom in situ), mikroinvasivt karsinom og intraduktal papillære neoplasmer (f.eks. sentralt papillom, perifert papillom, atypisk papillom, intraduktalt papillært karsinom, intracystisk papillært karsinom, godartede epiteliale lesjoner);

3. Godartede epiteliale lesjoner slik som adenose, herunder varianter (f.eks. skleroserende adenose, apokrin adenose, blunt duct-adenose, mikroglandulær adenose, adenomyoepitelial adenose), radialt arr / kompleks skleroserende lesjon og adenomer (f.eks. tubulært adenom, lakterende adenom, apokrint adenom, pleomorft adenom, duktalt adenom);

4. Myoepiteliale lesjoner slik som myoepiteliose, adenomyoepitelial adenose, adenomyoepiteliom og ondartet myoepiteliom;

5. Mesenkymale tumorer slik som sarkom, hemangiom, angiomatose, hemangiopericytom, pseudoangiomatøs stromal hyperplasi, myofibroblastom, fibromatose (aggressiv), inflammatorisk myofibroblastisk tumor, lipom (f.eks. angiolipom), granulærcelletumor, nevrofibrom, schwannom, angiosarkom, liposarkom, rabdomyosarkom, osteosarkom, leiomyom og leiomysarkom;

6. Fibroepiteliale tumorer slik som fibroadenom, phyllodes-tumor (f.eks. godartet, borderline, ondartet), lavgradig periduktalt stromalt sarkom og hamartom i brystet;

7. Tumorer i brystvorten slik som brystvorteadenom, syringomatøst adenom, og Pagets sykdom i brystvorten;

8. Ondartet lymfom;

9. Metastatiske tumorer; og

10. Tumorer i brystet hos menn slik som gynekomasti og karsinom in situ eller invasivt karsinom.

Duktalt karsinom er den vanligste brystkrefttypen hos kvinner og betyr utvikling av kreftceller i melkegangene i brystet. Det finnes i to former: invasivt duktalt karsinom (IDC), et invasivt, ondartet neoplasme og duktalt karsinom in situ (DCIS), et ikke-invasivt neoplasme. IDC er den vanligste formen for invasiv

brystkreft. Det står for cirka 80 % av alle brystkrefttyper. Ved mammografi visualiseres det vanligvis som en masse med fine tagger som går ut fra kantene. Ved fysisk undersøkelse føles denne klumpen vanligvis mye hardere eller fastere enn godartede brystlesjoner. Ved mikroskopisk undersøkelse invaderer og erstatter de kreftfremkallende cellene det omkringliggende normale vevet. DCIS er den vanligste typen av ikke-invasiv brystkreft hos kvinner. Etter hvert som screeningmammografi er blitt mer utbredt, er DCIS blitt én av de vanligst diagnostiserte brysttilstandene. Det omtales ofte som brystkreft i "stadium 0". DCIS oppdages vanligvis gjennom et mammogram som svært små flekker av kalsium kjent som mikrokalsifiseringer. Men ikke alle mikrokalsifiseringer indikerer forekomst av DCIS, hvilket må bekreftes ved biopsi. DCIS kan være multifokal, og behandling tar sikte på å eksisere alle de abnorme elementene i gangen og etterlate klare marginer. Behandling etter eksisjon inkluderer ofte lokal strålebehandling. Med egnet behandling er det usannsynlig at DCIS utvikler seg til invasiv kreft. Kirurgisk eksisjon med stråling senker risikoen for at DCIS vil komme tilbake, eller at det vil utvikle seg invasiv brystkreft.

Invasivt lobulært karsinom (ILC) er en type av brystkreft som starter i en lobulus og sprer seg til omkringliggende brystvev. Hvis ILC ikke behandles på et tidlig stadium, kan det spre seg til andre deler av kroppen, slik som livmoren eller eggstokkene. ILC er den nest vanligste typen av invasiv brystkreft og står for cirka 10–15 % av alle brystkrefttilfeller. ILC er karakterisert ved en generell fortykning av et område av brystet, vanligvis delen ovenfor brystvorten og mot armen. Det er mindre sannsynlig at ILC ses på et mammogram. Når det ses, kan det se ut som en masse med fine tagger som går fra kantene, eller som en asymmetri sammenlignet med det andre brystet.

<u>Behandlinger</u>

Det er demonstrert en rekke endringer i sentrale signaltransduksjonskomponenter ved brystkreft. Disse inkluderer: EGFR-mutasjoner som resulterer i aktivering, aktivering av andre reseptortyrosinkinaser slik som cMet, EGFR-aktivering med HER-2- og HER-3-aktivering eller HER-2-amplifikasjon, EGFR-aktivering med PI3K-mutasjon, EGFR-aktivering med PTEN-delesjon og EGFR-aktivering med Ras-mutasjon.

Forskjellige former for kjemoterapi retter seg mot forskjellige endringer i forskjellige komponenter i signaltransduksjonsveier.

Et mål kan samtidig være dannelse av nye blodkar til tumorceller, en prosess kalt angiogenese. VEGF er en endotelial celleoverlevelsesfaktor som er avgjørende for dannelse av nye blodkar. Én metode for modulasjon av VEGF-mediert angiogenese er følgelig å anvende antistoffer rettet mot selve VEGF-proteinet eller VEGFR. Bevacizumab, et rekombinant humanisert monoklonalt antistoff mot VEGF, virker synergistisk med kjemoterapi og har vært detektert å forbedre overlevelse hos pasienter med kolorektal-, bryst- og lungekreft.

Alle endokrine behandlinger er beregnet på å blokkere østrogenreseptor (ER)-funksjonen på en unik måte. Selektive østrogenreseptormodulatorer (SERM-er) slik som tamoksifen binder for eksempel ER og blokkerer delvis dens aktivitet. Eggstokkablasjon, luteiniserende hormon-frisettende hormonagonister og aromataseinhibitorer slik som anastrozol (Arimidex®), letrozol (Femara®) og exemestan (Aromasin®) reduserer østrogennivået og inhiberer ligandindusert aktivering av ER. En ideell SERM bør fungere som et antiøstrogen i brystet og livmoren og en partiell østrogenagonist i skjelettet, hjerte-kar-systemet og sentralnervesystemet samt mage-tarm-kanalen og vagina.

Steroidale antiøstrogener slik som fulvestrant binder ER enda mer, hvilket således blokkerer dens funksjon fullstendig og induserer reseptornedbryting.

Tamoksifen, en selektiv modulator av østrogenreseptor (ER), er det vanligst anvendte legemiddelet for behandling av ER-positiv brystkreft. Studier av adjuvant behandling med tamoksifen viser en 40 % til 50 % reduksjon i risikoen for tilbakefall og dødelighet. Tamoksifen tilveiebringer også midlertidig remisjon hos 30 % til 50 % av pasienter med metastatisk sykdom, og det er også virkningsfullt for forebygging av brystkreft.

Aromataseinhibitorer begynner å bli pleiestandarden for behandling av postmenopausale kvinner med brystkreft, mens tamoksifen fortsatt er standarden for premenopausale kvinner. Selv om aromataseinhibitorer kan være litt mer virkningsfulle enn tamoksifen, er det fortsatt et viktig legemiddel på

grunn av sine dokumenterte fordeler i sekvens med disse midlene for adjuvant behandling, og fordi det vil fortsette å spille en rolle i metastatisk sykdom.

Resistens

De novo-resistens (ingen respons på initial behandling, primær resistans) og ervervet resistens (tilbakefall eller progresjon av sykdom etter å ha vist en initial respons på behandling, sekundær resistens) overfor tamoksifen er vesentlige problemer. Forståelse av tumorbiologi og resistensmekanismene kan følgelig gi vesentlige kliniske effekter.

ER/PR-biologi: ER og PR er nukleære hormonreseptorer som fungerer som transkripsjonsfaktorer i kjernen når de er bundet til ligander. ER og PR har lignende strukturer og inneholder et DNA-bindingsdomene, et dimeriseringsdomene, et hormonbindingsdomene og flere transkripsjonsaktiveringsdomener. Det ble notert en større reduksjon i risiko for tilbakefall for pasienter med ER-positive, PR-positive tumorer sammenlignet med dem med ER-positive, PR-negative tumorer.

ER-funksjon: Hormonbinding til ER aktiverer proteinet gjennom fosforylering, dissosierer "chaperone"-proteiner slik som varmesjokkprotein 90 og forandrer dets konformasjon. Hormonbundet ("aktivert") ER dimeriserer deretter med en annen reseptor, og dimeren binder til østrogenresponselementer (spesifikke DNA-sekvenser) i promoteren for østrogenresponsive gener. Promoterbundne ER-dimere danner et kompleks med samtidig regulerende proteiner slik som amplifisert ved brystkreft 1 (AIB1 eller SRC3) som virker samordnet for å påvirke transkripsjonen av østrogenresponsive gener. Koaktivatorer binder typisk ER når reseptoren er bundet av østrogen, mens korepressorer binder når ER er bundet av tamoksifen. AIB1 er overuttrykt i 65 % av brystkrefttilfeller, og tilsvarende gen er amplifisert i 5 %. Høye nivåer av AIB1 kan bidra til SERM-resistens ved forsterking av østrogenagonistaktiviteten (f.eks. behandling med aromataseinhibitorer). ER-dimere danner også komplekser med korepressorproteiner slik som NCOR for å nedregulere genekspresjon av visse gener (f.eks. HOXB13).

Flere kinaser i vekstfaktorsignaliseringsnettene kan også aktivere ER i en prosess kalt liganduavhengig aktivering. Under visse betingelser slik som høy aktivitet i ErbB-familien (f.eks. høy HER-2- eller HER-1-aktivitet) danner ER bundet til tamoksifen kompleks med AIB1, hvilket resulterer i økt østrogenagonistaktivitet av tamoksifen (f.eks. behandling med fulvestrant eller aromataseinhibitorer sammen med kinaseinhibitorer).

Denne ikke-nukleære ER-virkningen eller membraninitierte steroidsignaliseringen (MISS) skjer minutter etter tilsetning av østrogen. SERM-er slik som tamoksifen kan også aktivere membran-ER. Disse reseptorene er detektert i ben-, nerve-, livmor-, fett- og endotelceller. Man begynner å klarlegge mekanismer hvorved østrogen aktiverer membran-ER-funksjonen. Det er observert direkte interaksjoner mellom ER og en rekke membransignaliserende molekyler slik som den insulinlignende vekstfaktor 1-reseptoren, den p85-regulerende underenheten av PI3K, Src og Shc, et protein som kan binde ER direkte til en rekke vekstfaktor-tyrosinkinasereseptorer. Aktivering av disse signalveiene ved hjelp av østrogen sender kraftige celleoverlevelses- og celleproliferasjonssignaler via aktivering av Akt og MAPK. Disse kinasene kan dessuten fosforylere ER og dens koregulatorer for å øke nukleær ER-signalering. Fosforylering av disse proteinene kan også øke den østrogenagonistlignende aktiviteten av tamoksifen og andre SERM-er.

Ren østrogendempende fulvestrant aktiverer ikke membran-ER på denne måten. Men SERM-er slik som tamoksifen aktiverer membran-ER på en lignende måte som østrogen. Membranvirkningene av ER, som den nukleære aktiviteten, kan være celle-, reseptorundertype- og ligandspesifikk, og det kan også være påvirket av at vekstfaktorens signaliseringsmiljø er langt mer fremtredende, f.eks. ved brystkrefttyper som overuttrykker ErbB1 eller HER-2. Stimulering av MISS-aktiviteten til ER ved hjelp av tamoksifen og andre SERM-er kan delvis forklare resistensen overfor disse midlene som av og til observeres i HER-2-overuttrykkende tumorer.

I tillegg til ER-funksjoner assosiert med kjerne- og plasmamembranen (membraninitiert steroidsignalisering, MISS) konjugerer ER med andre signalveimolekyler for å lette etterfølgende tumorprogresjon. Denne molekylære krysstalen kan best behandles med aromataseinhibitorer og ikke SERM-er.

ER har minst to hovedfunksjoner. Den fungerer som transkripsjonsfaktor for østrogenregulerte gener og koaktivator for andre transkripsjonsfaktorer i kjernen. Det fungerer også i cytoplasmaet og i plasmamembranen for å aktivere vekstfaktorsignalisering. I noen brysttumorer, særlig dem med svært aktive vekstfaktorsignalveier slik som HER-2-amplifikasjon, etableres det en ond sirkel hvor østrogen aktiverer vekstfaktorsignalisering og vekstfaktorens signalvei videre aktiverer ER. Østrogen i slike tumorer ville forventes å være en dominerende faktor ved å aktivere flere signalveier som er viktige for tumorprogresjon. Denne molekylære krysstalen har viktige ringvirkninger for behandlingen av brystkreft. Som et eksempel bør østrogendepriverende behandling med aromataseinhibitorer være mer virkningsfullt enn SERM-er i HER-2-amplifiserte tumorer ved avstengning av både den nukleærinitierte steroidsignaliseringen og MISS-aktiviteten til ER.

Metastatisk sykdom

Minst to tredjedeler av brysttumorer er avhengig av østrogen for å vokse. Det kan anvendes en rekke østrogenblokkerende midler for behandling av metastatisk brystkreft. Disse midlenes behandlingsrespons er imidlertid uberegnelig, og cirka én tredjedel av pasienter med metastatisk brystkreft med reseptorer for østrogen eller progesteron oppnår ingen fordel av hormonbehandling. Nesten alle pasienter med metastatisk brystkreft vil til slutt bli resistente overfor hormonbehandling selv om hormonreseptorene fortsatt er til stede.

Valg av behandling bestemmes på grunnlag av aktivering av signalveier eller en bedre forståelse av tumorbiologi. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer med fordel en assaymetode sammen med en diagnostisk/prognostisk brikke for å hjelpe onkologer med å finne den beste behandlingen for individuelle pasienter.

V. Konstruksjon av antistoffarrayer

I visse aspekter detekteres aktiveringsstatus for et flertall av signaltransduksjonsmolekyler i en cellulær ekstrakt av tumorceller slik som

sirkulerende celler i en fast tumor ved hjelp av et antistoffbasert array omfattende en fortynningsserie av innfangingsantistoffer fastholdt på et fast underlag. Arrayene omfatter typisk et flertall av forskjellige innfangingsantistoffer ved et område av innfangingsantistoffkonsentrasjoner som er koblet til overflaten av det faste underlaget på forskjellige adresserbare steder.

Det faste underlaget kan omfatte et hvilket som helst egnet substrat for immobilisering av proteiner. Eksempler på faste underlag inkluderer blant annet glass (f.eks. en glassplate), plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membraner, fiberbunter, geler, metall, keramikk og lignende. Membraner slik som nylon (Biotrans™, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA), Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), nitrocellulose (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) og PVDF (Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA)) er egnet til anvendelse som faste underlag i arrayene som anvendes i den foreliggende oppfinnelsen. Innfangingsantistoffene fastholdes foretrukket på glassplater overtrukket med en nitrocellulosepolymer, f.eks. FAST®-plater, som er kommersielt tilgjengelige fra Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Særlige aspekter av det faste underlaget som er ønskelige, inkluderer evnen til å binde store mengder av innfangingsantistoffer og evnen til å binde innfangingsantistoffer med minimal denaturering. Et annet egnet aspekt er at det faste underlaget viser minimal "vekevirkning" når antistoffløsninger inneholdende innfangingsantistoffer anvendes på underlaget. Et fast underlag med minimal vekevirkning gjør at små alikvoter av innfangingsantistoffløsningen som anvendes på underlaget, resulterer i små, definerte punkter av immobilisert innfangingsantistoff.

Innfangingsantistoffene fastholdes typisk direkte eller indirekte (f.eks. via innfangingsmerker) på det faste underlaget via kovalente eller ikke-kovalente interaksjoner (f.eks. ionebindinger, hydrofobe interaksjoner, hydrogenbindinger, van der Waals-krefter, dipole-dipole bindinger). I noen utførelsesformer er innfangingsantistoffene kovalent bundet til det faste underlaget ved hjelp av en homobifunksjonell eller heterobifunksjonell krysslinker ved hjelp av standardmetoder og -betingelser for kryssbinding. Egnede krysslinkere er

kommersielt tilgjengelige fra forhandlere slik som for eksempel Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Fremgangsmåter for generering av arrayer som er egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer blant annet enhver teknikk som anvendes til å konstruere protein- eller nukleinsyrearrayer. I noen utførelsesformer spottes innfangingsantistoffene på et array ved hjelp av en mikrospotter, som typisk er robotskrivere utstyrt med låsepinner, stumpe pinner eller blekkskrivere. Egnede robotsystemer for utskrift av antistoffarrayene beskrevet heri inkluderer PixSys 5000-roboten (Cartesian Technologies; Irvine, CA) med ChipMaker2-låsepinner (TeleChem International; Sunnyvale, CA) og andre robotskrivere som er tilgjengelige fra BioRobics (Woburn, MA) og Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Minst 2, 3, 4, 5 eller 6 replikasjoner av hver innfangingsantistoffortynning spottes foretrukket på arrayet.

En annen fremgangsmåte for generering av arrayer som er egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen, omfatter overføring av et kjent volum av en innfangingsantistoffortynning på hver valgt arrayposisjon ved opprettelse av kontakt med en kapillarrørdispenser på et fast underlag under betingelser som er virkningsfulle for å tappe et definert væskevolum på underlaget, hvor denne prosessen gjentas ved hjelp av valgte innfangingsantistoffortynninger på hver valgt arrayposisjon for å danne et fullstendig array. Fremgangsmåtene kan utføres ved dannelse av et flertall av slike arrayer, hvor løsningsavsetningstrinnet anvendes på en valgt posisjon på hvert av et flertall av faste underlag ved hver gjentatt syklus. En ytterligere beskrivelse av en slik fremgangsmåte finnes for eksempel i US-patent nr. 5 807 522.

I visse tilfeller kan det anvendes anordninger for utskrift på papir til å generere antistoffarrayene. Den ønskede innfangingsantistoffortynningen kan for eksempel lastes inn i skriverhodet på en stasjonær blekkskriver og skrives på et egnet fast underlag (se for eksempel Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036–2043 (1998)).

I noen utførelsesformer har arrayet generert på det faste underlaget en densitet på minst cirka 5 punkter/cm^2, og foretrukket minst cirka 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220,

230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 eller 10 000 punkter/cm^2.

I visse tilfeller representerer hvert punkt på det faste underlaget et forskjellig innfangingsantistoff. I visse andre tilfeller representerer flere punkter på det faste underlaget samme innfangingsantistoff, f.eks. som en fortynningsserie omfattende en serie av reduserende innfangingsantistoffkonsentrasjoner.

Ytterligere eksempler på fremgangsmåter for fremstilling og konstruksjon av antistoffarrayer på faste underlag er beskrevet i US-patent nr. 6 197 599, 6 777 239, 6 780 582, 6 897 073, 7 179 638 og 7 192 720, US-patentpublikasjon nr. 20060115810, 20060263837, 20060292680 og 20070054326 og Varnum et al., Methods Mol. Biol., 264:161–172 (2004).

Fremgangsmåter for skanning av antistoffarrayer er kjent i teknikken og inkluderer blant annet enhver teknikk som anvendes til å skanne protein- eller nukleinsyrearrayer. Mikroarrayskannere som er egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen, er tilgjengelige fra PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) og Axon Instruments (Union City, CA). Som et ikke-begrensende eksempel kan det anvendes et GSI ScanArray3000 for fluorescensdetektering med ImaGene-programvare for kvantifisering.

VI. Proksimitetsdeteksjonsassayer

Assayet for detektering av aktiveringsstatus for en særlig aktuell analytt (f.eks. signaltransduksjonsmolekyl) i en cellulær ekstrakt av tumorceller slik som sirkulerende celler i en fast tumor er et multiplekset proksimitetsassay med høy gjennomstrømning (dvs. tre antistoffer) med forbedret dynamisk område. De tre antistoffene som anvendes i proksimitetsassayet, kan omfatte: (1) et innfangingsantistoff som er spesifikt for analytten, (2) et deteksjonsantistoff som er spesifikt for en aktivert form av analytten (dvs. aktiveringsstatusavhengig antistoff) og (3) et deteksjonsantistoff som detekterer den totale mengden av analytten (dvs. aktiveringsstatusuavhengig antistoff). Det aktiveringsstatusavhengige antistoffet er i stand til å detektere for eksempel

fosforylerings-, ubiquinerings- og/eller komplekseringsstatus for analytten. Det aktiveringsstatusavhengige antistoffet er generelt i stand til å detektere både de aktiverte og ikke-aktiverte formene av analytten.

Proksimitetsassayet omfatter:
(i) inkubering av den cellulære ekstrakten med et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer for å danne et flertall av innfangne analytter,
(ii) inkubering av flertallet av innfangne analytter med deteksjonsantistoffer omfattende et flertall av aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og et flertall av aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter,
hvor de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene merkes med glukoseoksidase, en tilretteleggingsenhet, de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar, og tilretteleggingsenheten glukoseoksidase genererer et oksideringsmiddel som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet,
(iii) inkubering av flertallet av detekterbare innfangne analytter med et andre medlem av signalamplifikasjonsparet for å generere et amplifisert signal, og
(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra de første og andre medlemmene av signalamplifikasjonsparet.

Det er alternativt beskrevet at de aktiveringsstatusavhengige antistoffene kan merkes med en tilretteleggingsenhet, og at de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene kan merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar.

Proksimitetsassayene beskrevet heri er typisk antistoffbaserte arrayer som omfatter et flertall av forskjellige innfangingsantistoffer ved et område av innfangingsantistoffkonsentrasjoner som er bundet til overflaten av et fast underlag på forskjellige adresserbare steder. Eksempler på egnede faste underlag til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen er beskrevet ovenfor.

Innfangingsantistoffene, de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene og de aktiveringsstatusavhengige antistoffene er foretrukket valgt for å begrense konkurransen mellom dem med hensyn til analyttbinding (dvs. alle antistoffer kan samtidig binde sine tilsvarende signaltransduksjonsmolekyler).

I noen utførelsesformer omfatter de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene videre en detekterbar enhet. I slike tilfeller er mengden av den detekterbare enheten korrelativ med mengden av én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten. Eksempler på detekterbare enheter inkluderer blant annet fluorescerende merker, kjemisk reaktive merker, enzymmerker, radioaktive merker og lignende. Den detekterbare enheten er foretrukket en fluorofor slik som et Alexa Fluor®-fargestoff (f.eks. Alexa Fluor® 647), fluorescein, fluoresceinisotiocyanat (FITC), Oregon Green™, rhodamin, Texas-rød, tetrarhodaminisotiocyanat (TRITC), et CyDye™-fluor (f.eks. Cy2, Cy3, Cy5) og lignende. Den detekterbare enheten kan bindes direkte eller indirekte til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken.

I visse tilfeller merkes de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene direkte med tilretteleggingsenheten. Tilretteleggingsenheten kan bindes til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. Enheten til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen er glukoseoksidase, som kan generere et oksideringsmiddel som kanaliserer til (dvs. er rettet mot) og reagerer med (dvs. binder, er bundet av eller danner et kompleks med) et annet molekyl som ligger nær (dvs. nærliggende i romlig forstand) tilretteleggingsenheten. Ikke-begrensende eksempler på oksideringsmidler inkluderer hydrogenperoksid (H_2O_2), et enkelt oksygen og alle andre forbindelser som overfører oksygenatomer eller får elektroner i en oksiderings-/reduksjonsreaksjon. Under nærvær av et egnet substrat (dvs. glukose) genererer tilretteleggingsenheten (dvs. glukoseoksidase) foretrukket et oksideringsmiddel (f.eks. hydrogenperoksid (H_2O_2), enkelt oksygen osv.) som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet (f.eks. pepperrotperoksidase (HRP), hapten beskyttet av en beskyttelsesgruppe, et enzym inaktivert av tioeterbinding til en enzyminhibitor osv.) når de to enhetene er i nærheten av hverandre.

I visse andre tilfeller merkes de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene indirekte med tilretteleggingsenheten via hybridisering mellom en oligonukleotidlinker konjugert til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene og en komplementær oligonukleotidlinker som er konjugert til tilretteleggingsenheten. Oligonukleotidlinkeren kan bindes til

tilretteleggingsenheten eller til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. I noen utførelsesformer har oligonukleotidlinkeren konjugert til tilretteleggingsenheten 100 % komplementaritet til oligonukleotidlinkeren konjugert til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene. I andre utførelsesformer omfatter oligonukleotidlinkerparet minst én, to, tre, fire, fem, seks eller flere uoverenstemmende regioner, f.eks. ved hybridisering under strenge hybridiseringsbetingelser. En fagperson vil forstå at aktiveringsstatusuavhengige antistoffer som er spesifikke for forskjellige analytter, enten kan være konjugert til samme oligonukleotidlinker eller til forskjellige oligonukleotidlinkere.

Lengden av oligonukleotidlinkerne som er konjugert til tilretteleggingsenheten eller til de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene, kan variere. Linkersekvensen kan generelt være minst cirka 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 eller 100 nukleotider lang. Tilfeldige nukleinsyresekvenser genereres typisk for binding. Som et ikke-begrensende eksempel kan et bibliotek av oligonukleotidlinkere utformes slik at det har tre distinktive tilstøtende domener: et spacerdomene, et signaturdomene og et konjugeringsdomene. Oligonukleotidlinkeren er foretrukket utformet for virkningsfull binding uten å ødelegge funksjonen til tilretteleggingsenheten eller de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene hvortil de er konjugert.

Oligonukleotidlinkersekvensene kan opprettes for å utformes slik at de forhindrer eller begrenser all sekundær strukturdannelse under en rekke assaybetingelser. Smeltetemperaturer overvåkes typisk omhyggelig for hvert segment innenfor linkeren slik at de kan delta i de samlede assayprosedyrene. Smeltetemperaturområdet for linkersekvensens segment er generelt mellom 1 og 10 °C. Dataalgoritmer (f.eks. OLIGO 6,0) for å bestemme smeltetemperatur, sekundær struktur og hairpinstruktur under definerte ioniske konsentrasjoner kan anvendes til å analysere hvert av de tre forskjellige domenene innenfor hver linker. De samlede kombinerte sekvensene kan også analyseres for sin strukturelle karakterisering og sin komparabilitet med andre konjugerte oligonukleotidlinkersekvenser, f.eks. hvorvidt de vil hybridisere under strenge hybridiseringsbetingelser til en komplementær oligonukleotidlinker.

Oligonukleotidlinkerens spacerregion gir tilstrekkelig separasjon av konjugeringsdomenet fra oligonukleotidkryssbindingsstedet. Konjugeringsdomenet fungerer for å binde molekyler merket med en komplementær oligonukleotidlinkersekvens til konjugeringsdomenet via nukleinsyrehybridisering. Den nukleinsyremedierte hybridiseringen kan utføres enten før eller etter dannelse av antistoff-analytt-kompleks (dvs. antigen), hvilket gir et mer fleksibelt assayformat. Til forskjell fra mange direkte antistoffkonjugeringsmetoder har binding av relativt små oligonukleotider til antistoffer eller andre molekyler minimal innvirkning på antistoffenes spesifikke affinitet for deres målanalytt eller på de konjugerte molekylenes funksjon.

I noen utførelsesformer kan oligonukleotidlinkerens signatursekvensdomene anvendes i komplekse multipleksede proteinassayer. Flere antistoffer kan konjugeres med oligonukleotidlinkere med forskjellige signatursekvenser. I multipleksede immunassayer kan det anvendes reporteroligonukleotidsekvenser merket med egnede prober til å detektere kryssreaktivitet mellom antistoffer og deres antigener i det multipleksede assayformatet.

Oligonukleotidlinkere kan konjugeres til antistoffer eller andre molekyler ved hjelp av flere forskjellige fremgangsmåter. Oligonukleotidlinkere kan for eksempel syntetiseres med en tiolgruppe i enten 5'- eller 3'-enden. Tiolgruppen kan avbeskyttes ved hjelp av reduksjonsmidler (f.eks. TCEP-HCl), og den resulterende linkeren kan renses ved hjelp av en avsaltingsrotasjonskolonne. Den resulterende avbeskyttede oligonukleotidlinkeren kan konjugeres til antistoffenes primæraminer eller andre proteintyper ved hjelp av heterobifunksjonelle krysslinkere slik som SMCC. 5'-fosfatgrupper på oligonukleotider kan alternativt behandles med vannløselig karbodiimid EDC for å danne fosfatestere og deretter bindes til aminholdige molekyler. I visse tilfeller kan diolet på 3'-riboseresten oksideres til aldehydgrupper og deretter konjugeres til antistoffenes amingrupper eller andre proteintyper ved hjelp av reduksjonsaminering. I visse andre tilfeller kan oligonukleotidlinkeren syntetiseres med en biotinmodifikasjon i enten 3'- eller 5'-enden og konjugeres til streptavidinmerkede molekyler.

Oligonukleotidlinkere kan syntetiseres ved hjelp av en hvilken som helst av en rekke teknikker som er kjent i teknikken, slik som dem beskrevet i Usman et al.,

J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987), Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990), Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677–2684 (1995) og Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). Syntesen av oligonukleotider benytter seg generelt av alminnelige nukleinsyrebeskyttelses- og bindingsgrupper, slik som dimetoksytrityl i 5'-enden og fosforamiditter i 3'-enden. Egnede reagenser for oligonukleotidsyntese, fremgangsmåter for nukleinsyreavbeskyttelse og fremgangsmåter for nukleinsyrerensing er kjent for fagpersoner.

I visse tilfeller merkes de aktiveringsstatusavhengige antistoffene direkte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet. Signalamplifikasjonsparmedlemmet kan bindes til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. I visse andre tilfeller er merkes de aktiveringsstatusavhengige antistoffene indirekte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet via binding mellom et første medlem av et bindingspar konjugert til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene og et andre medlem av bindingsparet konjugert til det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet. Bindingsparmedlemmene (f.eks. biotin/streptavidin) kan bindes til signalamplifikasjonsparmedlemmet eller til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. Eksempler på signalamplifikasjonsparmedlemmer inkluderer blant annet peroksidaser slik som pepperrotperoksidase (HRP), katalase, klorperoksidase, cytokrom c-peroksidase, eosinofilperoksidase, glutationperoksidase, laktoperoksidase, myeloperoksidase, tyroidperoksidase, deiodinase og lignende. Andre eksempler på signalamplifikasjonsparmedlemmer inkluderer haptener beskyttet av en beskyttelsesgruppe og enzymer inaktivert av tioeterbinding til en enzyminhibitor.

I ett eksempel på proksimitetskanalisering er tilretteleggingsenheten glukoseoksidase (GO), og det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet er pepperrotperoksidase (HRP). Når GO bringes i kontakt med et substrat slik som glukose, genereres et oksideringsmiddel (dvs. hydrogenperoksid (H_2O_2)). Hvis HRP er innenfor kanaliseringsproksimitet med GO, kanaliseres H_2O_2 generert av GO til og komplekserer med HRP for å danne et HRP-H_2O_2-kompleks, som under nærvær av det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet (f.eks. et kjemiluminescerende substrat slik som luminol eller isoluminol eller et fluorogensubstrat slik som tyramid (f.eks. biotintyramid), homovanillinsyre eller

4-hydroksyfenyleddiksyre) genererer et amplifisert signal. Fremgangsmåter for anvendelse av GO og HRP i et proksimitetsassay er beskrevet i for eksempel Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999). Når biotintyramid anvendes som det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet, oksiderer HRP-H_2O_2-komplekset tyramidet for å generere en reaktiv tyramidradikal som kovalent binder nærliggende nukleofile rester. Det aktiverte tyramidet detekteres enten direkte eller ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens slik som for eksempel en streptavidinmerket fluorofor eller en kombinasjon av en streptavidinmerket peroksidase og et kromogent reagens. Eksempler på fluoroforer som er egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer blant annet et Alexa Fluor®-fargestoff (f.eks. Alexa Fluor® 555), fluorescein, fluoresceinisotiocyanat (FITC), Oregon Green™, rhodamin, Texas-rød, tetrarhodaminisotiocynat (TRITC), et CyDye™-fluor (f.eks. Cy2, Cy3, Cy5) og lignende. Streptavidinmerket kan bindes direkte eller indirekte til fluoroforet eller peroksidasen ved hjelp av fremgangsmåter som er velkjent i teknikken. Ikke-begrensende eksempler på kromogene reagenser som er egnet til anvendelse i den foreliggende oppfinnelsen, inkluderer 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB), 3,3'-diaminobenzidin (DAB), 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfosyre) (ABTS), 4-klor-1-naptol (4CN) og/eller porfyrinogen.

Et eksempel på en protokoll for utførelse av proksimitetsassayene beskrevet heri er gitt i eksempel 4.

Den foreliggende oppfinnelsen kan anvende kit for utførelse av proksimitetsassayene beskrevet ovenfor, omfattende: (a) en fortynningsserie med et flertall av innfangingsantistoffer fastholdt på et fast underlag og (b) et flertall av deteksjonsantistoffer (f.eks. aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og aktiveringsstatusavhengige antistoffer). I noen tilfeller kan kitene videre inneholde anvisninger for fremgangsmåter for anvendelse av kitet for å detektere aktiveringsstatus for et flertall av signaltransduksjonsmolekyler i sirkulerende celler i en fast tumor. Kitene kan også inneholde hvilke som helst av de ytterligere reagensene beskrevet ovenfor med hensyn til utførelse av spesifikke fremgangsmåter ifølge den foreliggende oppfinnelsen slik som for eksempel et første og andre medlem av signalamplifikasjonsparet,

tyramidsignalamplifikasjonsreagenser, substrater for tilretteleggingsenheten, vaskebuffere osv.

VII. Produksjon av antistoffer

Genereringen og valget av antistoffer som ikke allerede er kommersielt tilgjengelige for analyse av aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler i tumorceller slik som sjeldne sirkulerende celler i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen, kan oppnås på flere måter. En måte er for eksempel å uttrykke og/eller rense et aktuelt polypeptid (dvs. antigen) ved hjelp av proteinekspresjon og rensingsmetoder som er kjent i teknikken, mens en annen måte er å syntetisere det aktuelle polypeptidet ved hjelp av fremgangsmåter for syntese av fastfasepeptider som er kjent i teknikken. Se for eksempel Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., bd. 182 (1990), Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., bd. 289 (1997), Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., 38:1192–99 (1990), Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255–60, (1995) og Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., 44:1326–31 (1996). Det rensede eller syntetiserte polypeptidet kan deretter injiseres for eksempel til mus eller harer for å generere polyklonale eller monoklonale antistoffer. En fagperson vil forstå at mange prosedyrer er tilgjengelige for produksjon av antistoffer, f.eks. som beskrevet i Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). En fagperson vil også forstå at bindingsfragmenter eller Fab-fragmenter som etterligner (f.eks. beholder de funksjonelle bindingsregionene til) antistoffer, også kan fremstilles fra genetisk informasjon ved forskjellige prosedyrer. Se for eksempel Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995) og Huse et al., J. Immunol., 149:3914–3920 (1992).

En rekke publikasjoner har i tillegg rapportert anvendelsen av fagvisningsteknologi for å produsere og screene biblioteker av polypeptider for binding til et valgt målantigen (se for eksempel Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378–6382 (1990), Devlin et al., Science, 249:404–406 (1990), Scott et al., Science, 249:386–388 (1990) og Ladner et al., US-patent nr. 5 571 698). Et grunnleggende konsept av fagvisningsmetoder er opprettelse av en fysisk binding mellom et polypeptid som er kodet av fag-DNA-et, og et

målantigen. Denne fysiske bindingen tilveiebringes av fagpartikkelen, som viser et polypeptid som del av en kapsid som omslutter faggenomet som koder for polypeptidet. Opprettelsen av en fysisk binding mellom polypeptider og deres genetiske materiale gir mulighet for samtidig massescreening av svært store antall av fag som bærer forskjellige polypeptider. Fag som viser et polypeptid med affinitet for et målantigen, binder til målantigenet, og dette faget anrikes ved affinitetsscreening til målantigenet. Identiteten til polypeptidene som vises fra disse fagene, kan bestemmes fra deres respektive genomer. Ved hjelp av disse fremgangsmåtene kan et polypeptid identifisert med en bindingsaffinitet for et ønsket målantigen deretter syntetiseres samlet ved klassiske midler (se for eksempel US-patent nr. 6 057 098).

Antistoffene som genereres ved disse fremgangsmåtene, kan deretter velges først ved screening for affinitet og spesifisitet med det rensede aktuelle polypeptidantigenet og eventuelt sammenligning av resultatene med affiniteten og spesifisiteten for antistoffene med andre polypeptidantigener som ønskes utelukket fra binding. Screeningmetoden kan involvere immobilisering av de rensede polypeptidantigenene i separate brønner på mikrotiterplater. Løsningen inneholdende et potensielt antistoff eller en potensiell gruppe av antistoffer plasseres deretter i de respektive mikrotiterbrønnene og inkuberes i cirka 30 minutter til 2 timer. Mikrotiterbrønnene vaskes deretter, og et merket sekundært antistoff (f.eks. et anti-mus-antistoff konjugert til alkalisk fosfatase hvis de økte antistoffene er antistoffer fra mus) tilsettes til brønnene og inkuberes i cirka 30 minutter for så å vaskes. Substrat tilsettes til brønnene, og det vil ses en fargereaksjon der hvor antistoff mot det immobiliserte polypeptidantigenet er til stede.

De således identifiserte antistoffene kan deretter analyseres videre for affinitet og spesifisitet. Under utviklingen av immunassayer for et målprotein fungerer det rensede målproteinet som en standard som kan brukes til å vurdere immunassayets sensitivitet og spesifisitet ved hjelp av valgte antistoffer. Siden bindingsaffiniteten for forskjellige antistoffer kan variere, f.eks. kan visse antistoffkombinasjoner forstyrre et annet sterisk, kan et antistoffs assayytelse være et viktigere mål enn absolutt affinitet og spesifisitet for det aktuelle antistoffet.

Fagpersoner vil forstå at det kan anvendes mange metoder til produksjon av antistoffer eller bindingsfragmenter og screening og valg for affinitet og spesifisitet for de forskjellige aktuelle polypeptidene, men disse metodene endrer ikke den foreliggende oppfinnelsens omfang.

A. Polyklonale antistoffer

Polyklonale antistoffer dyrkes foretrukket i dyr ved flere subkutane (sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av et aktuelt polypeptid og en adjuvant. Det kan være nyttig å konjugere det aktuelle polypeptidet til et proteinbærestoff som er immunogent i de artene som skal immuniseres, slik som for eksempel KLH (keyhole limpet hemocyanin), serumalbumin, bovint tyroglobulin eller soyabønnetrypsininhibitor ved hjelp av et bifunksjonelt eller deriverende middel. Ikke-begrensende eksempler på bifunksjonelle eller deriverende midler inkluderer maleimidobenzoylsulfosuksinimidester (konjugering gjennom cysteinrester), N-hydroksysuksinimid (konjugering gjennom lysinrester), glutaraldehyd, sukkinanhydrid, $SOCl_2$ og $R_1N = C = NR$, hvor R og R_1 er forskjellige alkylgrupper.

Dyr immuniseres mot det aktuelle polypeptidet eller et immungenkonjugat eller -derivat derav ved kombinasjon av for eksempel 100 µg (for kaniner) eller 5 µg (for mus) av antigenet eller konjugatet med 3 volumer av Freunds fullstendige adjuvant og intradermal injeksjon av løsningen på forskjellige steder. Én måned senere får dyrene på nytt cirka 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden av polypeptid eller konjugat i Freunds ufullstendige adjuvant ved subkutan injeksjon på forskjellige steder. Sju til fjorten dager senere tappes dyrene for blod, og serumet analyseres for antistofftiter. Dyr får typisk påfyllingsdose inntil titeret når et platå. Dyret får fortrinnsvis påfyllingsdose med konjugatet av samme polypeptid, men det kan anvendes konjugering til et annet immungenprotein og/eller gjennom et annet kryssbindingsreagens. Konjugater kan også fremstilles i rekombinant cellekultur som fusjonsproteiner. I visse tilfeller kan aggregerende midler slik som alun anvendes til å forsterke immunresponsen.

B. Monoklonale antistoffer

Monoklonale antistoffer oppnås generelt fra en populasjon av i det vesentlige homogene antistoffer, dvs. de individuelle antistoffene omfattende populasjonen er identiske unntatt for mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Adjektivet "monoklonal" indikerer således at antistoffets karakter ikke er en blanding av atskilte antistoffer. Monoklonale antistoffer kan for eksempel fremstilles ved hjelp av hybridommetoden beskrevet av Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) eller ved en hvilken som helst rekombinant DNA-metode som er kjent i teknikken (se for eksempel US-patent nr. 4 816 567).

I hybridommetoden immuniseres en mus eller andre egnede vertsdyr (f.eks. hamster) som beskrevet ovenfor for å fremkalle lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som spesifikt binder til det aktuelle polypeptidet som anvendes til immunisering. Lymfocytter immuniseres alternativt *in vitro.* De immuniserte lymfocyttene fusjoneres deretter med myelomceller ved hjelp av et egnet fusjonsmiddel, slik som polyetylenglykol, for å danne hybridomceller (se for eksempel Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, s. 59–103 (1986)). De således fremstilte hybridomcellene utsås og dyrkes i et egnet kulturmedium som foretrukket inneholder ett eller flere stoffer som inhiberer veksten eller overlevelsen av de ufusjonerte, parentale myelomcellene. Hvis for eksempel de parentale myelomcellene mangler enzymet hypoksantinguaninfosforibosyltransferase (HGPRT), vil kulturmediet for hybridomcellene typisk inkludere hypoksantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), hvilket forebygger veksten av celler uten HGPRT.

Foretrukne myelomceller er dem som fusjonerer effektivt, støtter stabil produksjon på høyt nivå av antistoff ved de valgte antistoffproduserende cellene og/eller er sensitive overfor et medium slik som HAT-medium. Eksempler på slike foretrukne myelomcellelinjer for produksjon av humane monoklonale antistoffer inkluderer blant annet murine myelomlinjer slik som dem avledet fra MOPC-21- og MPC-11-tumorer hos mus (tilgjengelig fra Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), SP-2- eller X63-Ag8-653-celler (tilgjengelig fra American Type Culture Collection; Rockville, MD) og humane myelom- eller mus-humane heteromyelomcellelinjer (se for eksempel Kozbor, J. Immunol.,

133:3001 (1984) og Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, s. 51–63 (1987)).

Kulturmediet hvor hybridomceller dyrkes, kan analyseres for produksjon av monoklonale antistoffer rettet mot det aktuelle polypeptidet. Bindingsspesifisiteten til monoklonale antistoffer produsert av hybridomceller bestemmes foretrukket ved immunutfelling eller ved et *in vitro*-bindingsassay, slik som et radioimmunassay (RIA) eller et enzymbundet immunabsorbentassay (ELISA). Bindingsaffiniteten til monoklonale antistoffer kan bestemmes ved hjelp av for eksempel Scatchard-analysen i Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Etter at det er identifisert hybridomceller som produserer antistoffer med ønsket spesifisitet, affinitet og/eller aktivitet, kan klonene subklones ved begrensende fortynningsprosedyrer og dyrkes ved standardmetoder (se for eksempel Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, s. 59–103 (1986)). Egnede kulturmedier til dette formål inkluderer for eksempel D-MEM- eller RPMI-1640-medium. Hybridomcellene kan dessuten dyrkes *in vivo* som ascitestumorer hos et dyr. De monoklonale antistoffene som utskilles av subklonene, kan separeres fra kulturmediet, ascitesfluidet eller serumet ved klassiske fremgangsmåter for antistoffrensing slik som for eksempel protein A-sefarose, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi.

DNA som koder for de monoklonale antistoffene, kan enkelt isoleres og sekvenseres ved hjelp av klassiske fremgangsmåter (f.eks. ved hjelp av oligonukleotidsonder som kan binde spesifikt til gener som koder for de tunge og lette kjedene i murine antistoffer). Hybridomcellene fungerer som den foretrukne kilde til slikt DNA. Når DNA-et er isolert, kan det plasseres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres til vertsceller slik som *E. coli*-celler, COS-celler fra menneskeaper, CHO-celler eller myelomceller som ellers ikke produserer antistoff, for å indusere syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. Se for eksempel Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5:256–262 (1993) og Pluckthun, Immunol Rev., 130:151–188 (1992). DNA-et kan også modifiseres for eksempel ved substitusjon av kodingssekvensen for humane konstante tung- og lettkjede-domener med homologe murine sekvenser (se for

eksempel US-patent nr. 4 816 567 og Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)) eller ved kovalent binding til immunglobulinkodingssekvensen av hele eller deler av kodingssekvensen for et ikke-immunglobulinpolypeptid.

I en ytterligere utførelsesform kan monoklonale antistoffer eller antistoffragmenter isoleres fra antistoffagbiblioteker generert ved hjelp av teknikkene beskrevet i for eksempel McCafferty et al., Nature, 348:552–554 (1990), Clackson et al., Nature, 352:624–628 (1991) og Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581–597 (1991). Produksjonen av humane monoklonale antistoffer med høy affinitet (nM-område) ved kjedeombytting er beskrevet i Marks et al., BioTechnology, 10:779–783 (1992). Anvendelsen av kombinatorisk infeksjon og *in vivo*-rekombinasjon som en strategi for konstruksjon av svært store fagbiblioteker er beskrevet i Waterhouse et al., Nuc. Acids Res., 21:2265–2266 (1993). Disse teknikkene er således aktuelle alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoffhybridommetoder for generering av monoklonale antistoffer.

C. Humaniserte antistoffer

Fremgangsmåter for humanisering av ikke-humane antistoffer er kjent i teknikken. Et humanisert antistoff har foretrukket én eller flere aminosyrerester innført i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerestene kalles ofte "importrester", som typisk tas fra et variabelt "importdomene". Humanisering kan hovedsakelig utføres ved substitusjon av den hypervariable regionens sekvenser i et ikke-humant antistoff med de tilsvarende sekvensene i et humant antistoff. Se for eksempel Jones et al., Nature, 321:522–525 (1986), Riechmann et al., Nature, 332:323–327 (1988) og Verhoeyen et al., Science, 239:1534–1536 (1988). Slike "humaniserte" antistoffer er således kimære antistoffer (se for eksempel US-patent nr. 4 816 567), hvor vesentlig mindre enn et intakt humant variabelt domene er substituert med tilsvarende sekvens fra en ikke-human art. Humaniserte antistoffer er i praksis typisk humane antistoffer hvor noen hypervariabel region-rester og eventuelt noen strukturregionrester (FR) substitueres med rester fra analoge steder i gnagerantistoffer.

Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal anvendes til fremstilling av de humaniserte antistoffene beskrevet heri, er et viktig hensyn for reduksjon av antigenisitet. Ifølge den såkalte "best-fit"-metoden screenes det variable domenets sekvens i et gnagerantistoff mot hele biblioteket av kjente humane sekvenser i det variable domenet. Den humane sekvensen som er nærmest gnagerens, aksepteres deretter som den humane FR for det humaniserte antistoffet (se for eksempel Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993) og Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). En annen fremgangsmåte anvender en særlig FR avledet fra konsensussekvensen for alle humane antistoffer av en særlig undergruppe av lette eller tunge kjeder. Den samme FR kan anvendes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (se for eksempel Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992) og Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Det er også viktig at antistoffer humaniseres med retensjon av høy affinitet for antigenet og andre fordelaktige biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet kan humaniserte antistoffer fremstilles ved en analyseprosess for parentale sekvensene og forskjellige konseptuelle humaniserte produkter ved hjelp av tredimensjonale modeller av de parentale og humaniserte sekvensene. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er vanligvis tilgjengelige og kjent for fagpersoner. Det finnes dataprogrammer som illustrerer og viser sannsynlige tredimensjonale konformasjonsstrukturer av valgte kandidatimmunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse visningene gir mulighet for analyse av den sannsynlige rollen til restene i funksjonen til kandidatimmunglobulinsekvensen, dvs. analyse av rester som påvirker kandidatimmunglobulinets evne til å binde antigenet. FR-enheter kan således velges og kombineres fra mottager- og importsekvensene, slik at det oppnås ønsket antistoffkarakteristikk, slik som økt affinitet for målantigenene. Den hypervariable regionens rester er generelt direkte og spesifikt involvert i påvirkningen av antigenbinding.

Forskjellige former for humaniserte antistoffer er tiltenkt ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Det humaniserte antistoffet kan for eksempel være et antistoffragment, slik som et Fab-fragment. Det humaniserte antistoffet kan alternativt være et intakt antistoff, slik som et intakt IgA-, IgG- eller IgM-antistoff.

D. Humane antistoffer

Som et alternativ til humanisering kan det dannes humane antistoffer. I noen utførelsesformer kan det produseres transgene dyr (f.eks. mus) som er i stand til ved immunisering å produsere et fullt repertoar av humane antistoffer under fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Det er for eksempel beskrevet at den homozygote delesjon av antistoffets tungkjede-koblingsregion-gen hos kimære og kjønnscellemutante mus resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av det humane kjønnscelle-immunglobulingenarrayet til slike kjønnscellemutante mus vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigenprovokasjon. Se for eksempel Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362:255–258 (1993), Bruggermann et al., Year in Immun., 7:33 (1993) og US-patent nr. 5 591 669, 5 589 369 og 5 545 807.

Fagvisningsteknologi (se for eksempel McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) kan eventuelt anvendes til å produsere humane antistoffer og antistoffragmenter *in vitro* ved hjelp av immunglobulinets variable (V) domenegenrepertoar fra ikke-immuniserte donorer. Ifølge denne teknikken klones antistoffets V-domenegener i rammen til enten et større eller mindre kappeproteingen av et filamentøst bakteriofag, slik som M13 eller fd, og vises som funksjonelle antistoffragmenter på overflaten av fagpartikkelen. Siden den filamentøse partikkelen inneholder en enkelttrådet DNA-kopi av faggenomet, resulterer valg basert på antistoffets funksjonelle egenskaper også i valg av genet som koder for antistoffet som viser disse egenskapene. Faget kopierer således noen av B-cellens egenskaper. Fagvisning kan utføres i en rekke formater som beskrevet i for eksempel Johnson et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 3:564–571 (1993). Flere kilder til V-gensegmenter kan anvendes til fagvisning. Se for eksempel Clackson et al., Nature, 352:624–628 (1991). Det kan konstrueres et repertoar av V-gener fra ikke-immuniserte humane donorer, og antistoffer mot en mangfoldig serie av antigener (omfattende selv-antigener) kan isoleres i det vesentlige etter teknikkene beskrevet i Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581–597 (1991), Griffith et al., EMBO J., 12:725–734 (1993) og US-patent nr. 5 565 332 og 5 573 905.

I visse tilfeller kan humane antistoffer genereres av *in vitro*-aktiverte B-celler som beskrevet i for eksempel US-patent nr. 5 567 610 og 5 229 275.

E. Antistoffragmenter

Det er utviklet forskjellige teknikker for produksjon av antistoffragmenter. Disse fragmentene ble tradisjonelt avledet via proteolytisk nedbryting av intakte antistoffer (se for eksempel Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth., 24:107–117 (1992) og Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Men disse fragmentene kan nå fremstilles direkte ved hjelp av rekombinante vertsceller. Antistoffragmentene kan for eksempel isoleres fra antistoffagbibliotekene behandlet ovenfor. Fab'-SH-fragmentene kan alternativt gjenvinnes direkte fra *E. coli*-celler og bindes kjemisk for å danne $F(ab')_2$-fragmenter (se for eksempel Carter et al., BioTechnology, 10:163–167 (1992)). Ifølge en annen metode kan $F(ab')_2$-fragmenter isoleres direkte fra rekombinant vertscellekultur. Andre teknikker for produksjon av antistoffragmenter vil være åpenbare for fagpersoner. I andre utførelsesformer er det valgte antistoffet et enkjedet Fv-fragment (scFv). Se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 93/16185 og US-patent nr. 5 571 894 og 5 587 458. Antistoffragmentet kan også være et rettkjedet antistoff som beskrevet for eksempel i US-patent nr. 5 641 870. Slike rettkjedede antistoffragmenter kan være monospesifikke eller bispesifikke.

F. Bispesifikke antistoffer

Bispesifikke antistoffer er antistoffer som har bindingsspesifisitet for minst to forskjellige epitoper. Eksempelvis kan bispesifikke antistoffer binde til to forskjellige epitoper av det samme aktuelle polypeptidet. Andre bispesifikke antistoffer kan kombinere et bindingssted for det aktuelle polypeptidet med bindingsstedene for ett eller flere ytterligere antigener. Bispesifikke antistoffer kan fremstilles som antistoffer av full lengde eller antistoffragmenter (f.eks. bispesifikke $F(ab')_2$-antistoffer).

Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjent i teknikken. Tradisjonell produksjon av bispesifikke antistoffer av full lengde er basert på samtidig ekspresjon av tungkjede-lettkjede-paret til to immunglobuliner, hvor de to kjedene har forskjellig spesifisitet (se for eksempel Millstein et al., Nature,

305:537–539 (1983)). På grunn av det tilfeldige utvalget av immunglobulinets tunge og lette kjeder produserer disse hybridomene (kvadromene) en potensiell blanding av 10 forskjellige antistoffmolekyler hvor bare ett har den riktige bispesifikke strukturen. Rensing av det riktige molekylet utføres vanligvis ved affinitetskromatografi. Lignende fremgangsmåter er beskrevet i PCT-publikasjon nr. WO 93/08829 og Traunecker et al., EMBO J., 10:3655–3659 (1991).

Ifølge en annen fremgangsmåte fusjoneres antistoffets variable domener med ønsket bindingsspesifisitet (kombineringssteder for antistoff/antigen) til sekvenser i immunglobulinets konstante domener. Den foretrukne fusjonen er med et immunglobulins konstante tungkjede-domene, omfattende minst en del av hengsel-, CH2- og CH3-regionene. Det er foretrukket å ha den første konstante tungkjede-regionen (CH1) inneholdende stedet som er nødvendig for lettkjedebinding i minst én av fusjonene. DNA som koder for immunglobulinets tungkjedefusjoner og eventuelt immunglobulinets lette kjede, plasseres i separate ekspresjonsvektorer og ko-transfekteres til en egnet vertsorganisme. Dette gir stor fleksibilitet for justering av de gjensidige proporsjonene av de tre polypeptidfragmentene i utførelsesformer når ulike forhold av de tre polypeptidkjedene som anvendes i konstruksjonen, gir de optimale utbyttene. Det er imidlertid mulig å sette inn kodingssekvensene for to eller alle tre av polypeptidkjedene til én ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like forhold resulterer i høye utbytter, eller når forholdene ikke er av særlig betydning.

I en foretrukket utførelsesform ifølge denne fremgangsmåten er de bispesifikke antistoffene sammensatt av et hybrid immunglobulins tunge kjede med en første bindingsspesifisitet i én arm, og et par av et hybrid immunglobulins tunge kjede / lette kjede (som gir en andre bindingsspesifisitet) i den andre armen. Denne asymmetriske strukturen letter separasjonen av den ønskede bispesifikke forbindelsen fra uønskede kjedekombinasjoner i immunglobulinet, siden forekomst av et immunglobulins lette kjede i bare én halvdel av det bispesifikke molekylet gir en enkel separasjonsmetode. Se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 94/04690 og Suresh et al., Meth. Enzymol., 121:210 (1986).

Ifølge en annen metode beskrevet i US-patent nr. 5 731 168 kan kontaktflaten mellom et par antistoffmolekyler konstrueres slik at den maksimerer

prosentandelen av heterodimerer som gjenvinnes fra rekombinant cellekultur. Den foretrukne kontaktflaten omfatter minst en del av CH3-domenet av et antistoffs konstante domene. I denne fremgangsmåten utbyttes én eller flere små aminosyresidekjeder fra kontaktflaten for det første antistoffmolekylet med større sidekjeder (f.eks. tyrosin eller tryptofan). Kompensatoriske "hulrom" av identisk eller lignende størrelse som de store sidekjedene opprettes på kontaktflaten til det andre antistoffmolekylet ved utbytting av store aminosyresidekjeder med mindre aminosyresidekjeder (f.eks. alanin eller treonin). Dette tilveiebringer en mekanisme for å øke utbyttet av heterodimerene fremfor andre uønskede sluttprodukter, slik som homodimerer.

Bispesifikke antistoffer omfatter kryssbundne antistoffer eller "heterokonjugat"-antistoffer. Ett av antistoffene i heterokonjugatet kan for eksempel være koblet til avidin, det andre til biotin. Heterokonjugatantistoffer kan fremstilles ved hjelp av en hvilken som helst praktisk kryssbindingsmetode. Egnede kryssbindingsmidler og -teknikker er velkjent i teknikken og er beskrevet i for eksempel US-patent nr. 4 676 980.

Egnede teknikker for generering av bispesifikke antistoffer fra antistoffragmenter er også kjent i teknikken. Bispesifikke antistoffer kan for eksempel fremstilles ved hjelp av kjemisk binding. I visse tilfeller kan bispesifikke antistoffer genereres ved en fremgangsmåte hvor intakte antistoffer spaltes proteolytisk for å generere $F(ab')_2$-fragmenter (se for eksempel Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Disse fragmentene reduseres under nærvær av ditiolkompleksdanneren natriumarsenitt for å stabilisere nærliggende ditioler og forebygge intermolekylær disulfiddannelse. De dannede Fab'-fragmentene omdannes deretter til tionitrobenzoat (TNB)-derivater. Ett av Fab'-TNB-derivatene rekonverteres deretter til Fab'-tiolet ved reduksjon med merkaptoetylamin og blandes med en ekvimolar mengde av det andre Fab'-TNB-derivatet for å danne det bispesifikke antistoffet.

I noen utførelsesformer kan Fab'-SH-fragmentene gjenvinnes direkte fra *E. coli* og bindes kjemisk for å danne bispesifikke antistoffer. Et fullstendig humanisert bispesifikt antistoff $F(ab')_2$-molekyl kan for eksempel produseres ved fremgangsmåtene beskrevet i Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217–225

(1992). Hvert Fab'-fragment ble separat utskilt fra *E. coli* og utsatt for kjemisk binding *in vitro* for å danne det bispesifikke antistoffet.

Det er også beskrevet forskjellige teknikker for fremstilling og isolering av bispesifikke antistoffragmenter direkte fra rekombinant cellekultur. Bispesifikke antistoffer fremstilles for eksempel ved hjelp av leucinglidelåser. Se for eksempel Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547–1553 (1992). Leucinglidelåspeptidene fra Fos- og Jun-proteinene ble bundet til Fab'-delene i to forskjellige antistoffer ved genfusjon. Antistoffhomodimerene ble redusert ved hengselsregionen for å danne monomerer og deretter reoksidert for å danne antistoffheterodimerene. Denne fremgangsmåten kan også anvendes til produksjon av antistoffhomodimerer. "Diastoff"-teknologien beskrevet av Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444–6448 (1993) har tilveiebrakt en alternativ mekanisme for fremstilling av bispesifikke antistoffragmenter. Fragmentene omfatter et variabelt tungkjede-domene (VH) bundet til et variabelt lettkjede-domene (VL) ved hjelp av en linker som er for kort til å muliggjøre paring mellom de to domenene på den samme kjeden. VH- og VL-domenene av ett fragment tvinges derfor til å pares med de komplementære VL- og VH-domenene av et annet fragment, og derved danne to antigenbindingssteder. En annen strategi for fremstilling av bispesifikke antistoffragmenter ved anvendelse av enkjedede Fv(sFv)-dimerer er beskrevet i Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Antistoffer med mer enn to valenser er også tiltenkt. Det kan for eksempel fremstilles trispesifikke antistoffer. Se for eksempel Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991).

G. Antistoffrensing

Ved anvendelse av rekombinante teknikker kan antistoffer produseres inne i en isolert vertscelle, i det periplasmiske rommet i en vertscelle eller direkte utskilt fra en vertscelle til mediet. Hvis antistoffet produseres intracellulært, fjernes først partikkelresten for eksempel ved sentrifugering eller ultrafiltrering. Carter et al., BioTech., 10:163–167 (1992) beskriver en fremgangsmåte for isolering av antistoffer som er utskilt til det periplasmiske rommet i *E. coli.* Cellepasta tines kort fortalt under nærvær av natriumacetat (pH 3,5), EDTA og

fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) i cirka 30 min. Cellerester kan fjernes ved sentrifugering. Hvis antistoffet utskilles til mediet, konsentreres supernatanter fra slike ekspresjonssystemer generelt ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter, f.eks. en Amicon- eller Millipore Pellicon-ultrafiltreringsenhet. En proteaseinhibitor slik som PMSF kan inngå i hvilke som helst av de foregående trinn for å inhibere proteolyse, og antibiotika kan omfattes for å forhindre veksten av tilfeldige urenheter.

Antistoffsammensetningen fremstilt fra celler kan renses ved hjelp av for eksempel hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse og affinitetskromatografi. Løseligheten til protein A som affinitetsligand avhenger av arten og isotypen av et hvilket som helst immunglobulin Fc-domene som er til stede i antistoffet. Protein A kan anvendes til å rense antistoffer som er basert på humane γ1-, γ2- eller γ4-tungkjeder (se for eksempel Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62:1–13 (1983)). Protein G anbefales for alle isotyper hos mus og for humane γ3 (se for eksempel Guss et al., EMBOJ., 5:1567–1575 (1986)). Matrisen hvortil affinitetsliganden er bundet, er oftest agarose, men andre matriser er tilgjengelige. Mekanisk stabile matriser, slik som kontrollert poreglass eller poly(styrendivinyl)benzen, gir mulighet for høyere strømningshastigheter og kortere behandlingstider enn det som kan oppnås med agarose. Hvis antistoffet omfatter et CH3-domene, er Bakerbond ABX™-resinen (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) nyttig for rensing. Andre teknikker for proteinrensing slik som fraksjonering på en ionebyttekolonne, etanolutfelling, HPLC med omvendt fase, kromatografi på silika, kromatografi på heparin, SEPHAROSE™-kromatografi på et anione- eller kationebytteresin (slik som en polyasparaginsyrekolonne), kromatofokusering, SDS-PAGE og ammoniumsulfatutfelling er også tilgjengelig avhengig av antistoffet som skal gjenvinnes.

Etter eventuelle innledende rensetrinn kan blandingen omfattende det aktuelle antistoffet og urenheter utsettes for hydrofob interaksjonskromatografi med lav pH ved hjelp av en elueringsbuffer ved en pH på mellom ca. 2,5 og 4,5, foretrukket utført ved lave saltkonsentrasjoner (f.eks. fra ca. 0 til 0,25 M salt).

En fagperson vil forstå at et hvilket som helst bindingsmolekyl med en funksjon som ligner på et antistoff, f.eks. et bindingsmolekyl eller en bindingspartner som

er spesifikk for én eller flere aktuelle analytter i en prøve, også kan anvendes i fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Eksempler på egnede antistofflignende molekyler inkluderer blant annet domeneantistoffer, unistoffer, nanostoffer, haiantigenreaktive proteiner, avimerer, adnektiner, antikalmer, affinitetsligander, pylomerer, aptamerer, affistoffer, trinektiner og lignende.

VIII. Fremgangsmåter for administrering

Anticancer-legemidlene beskrevet heri skal administreres til en pasient ved et hvilket som helst praktisk middel som er kjent i teknikken. Fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til å velge et egnet anticancer-legemiddel eller kombinasjoner av anticancer-legemidler for behandling av en tumor (f.eks. brysttumor) hos en pasient. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes til å identifisere responsen til en tumor (f.eks. brysttumor) hos en pasient på behandling med et anticancer-legemiddel eller kombinasjoner av anticancer-legemidler. Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen kan dessuten anvendes til å predikere responsen til en pasient med en tumor (f.eks. brysttumor) på behandling med et anticancer-legemiddel eller kombinasjoner av anticancer-legemidler. En fagperson vil forstå at anticancer-legemidlene beskrevet heri kan administreres alene eller som del av en kombinert terapeutisk metode med klassisk kjemoterapi, radioterapi, hormonbehandling, immunterapi og/eller kirurgi.

I visse utførelsesformer omfatter anticancer-legemiddelet et antisignaliseringsmiddel (dvs. et cytostatisk legemiddel) slik som et monoklonalt antistoff eller en tyrosinkinaseinhibitor, et antiproliferativt middel, et kjemoterapeutisk middel (f.eks. et cytotoksisk legemiddel), et terapeutisk hormonmiddel, et radioterapeutisk middel, en vaksine og/eller en hvilken som helst annen forbindelse med evne til å redusere eller oppheve den ukontrollerte veksten av unormale celler slik som kreftfremkallende celler. I noen utførelsesformer behandles pasienten med ett eller flere antisignaliseringsmidler, antiproliferative midler og/eller terapeutiske hormonmidler i kombinasjon med minst ett kjemoterapeutisk middel. Eksempler på monoklonale antistoffer, tyrosinkinaseinhibitorer, antiproliferative midler, kjemoterapeutiske midler,

hormonterapeutiske midler, radioterapeutiske midler og vaksiner er beskrevet ovenfor.

I noen utførelsesformer kan anticancer-legemidlene beskrevet heri samtidig administreres med klassiske immunterapeutiske midler, herunder blant annet immunstimulerende midler (f.eks. Bacillus Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleukin-2, alfa-interferon osv.), immuntoksiner (f.eks. monoklonalt anti-CD33-antistoff-kalikeamicin-konjugat, monoklonalt anti-CD22-antistoff-pseudomonaseksotoksin-konjugat osv.) og radioimmunterapi (f.eks. monoklonalt anti-CD20-antistoff konjugert til ^{111}In, ^{90}Y eller ^{131}I osv.).

Anticancer-legemidler kan administreres med en egnet farmasøytisk eksipient etter behov på en hvilken som helst administreringsmåte. Administreringen kan således for eksempel være oral, bukkal, sublingval, gingival, palatal, intravenøs, lokal, subkutan, transkutanøs, transdermal, intramuskulær, intraartikulær, parenteral, intraarteriell, intradermal, intraventrikulær, intrakraniell, intraperitoneal, intravesikal, intratekal, intralesjonal, intranasal, rektal, vaginal eller ved inhalering. Med "samtidig administrering" menes at anticancer-legemiddelet administreres samtidig, like før eller like etter administreringen av et andre legemiddel (f.eks. et annet anticancer-legemiddel, et legemiddel som er nyttig for reduksjon av bivirkningene assosiert med behandling med anticancer-legemiddel, et radioterapeutisk middel, et terapeutisk hormonmiddel, et immunterapeutisk middel osv.).

En terapeutisk virkningsfull mengde av et anticancer-legemiddel kan administreres gjentatte ganger, f.eks. minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 eller flere ganger, eller dosen kan administreres ved kontinuerlig infusjon. Dosen kan foreligge som faste, halvfaste eller flytende doseformer eller frysetørket pulver, slik som for eksempel tabletter, piller, pellets, kapsler, pulvere, løsninger, suspensjoner, emulsjoner, stikkpiller, retensjonsønemer, kremer, salver, lotioner, geler, aerosoler, skum eller lignende, foretrukket i enhetsdoseformer som er egnet til enkel administrering av nøyaktige doser.

Som anvendt heri betyr betegnelsen "enhetsdoseform" fysisk atskilte enheter som er egnet som enhetsdoser for humane pasienter og andre pattedyr, idet hver enhet inneholder en forhåndsbestemt mengde av et anticancer-legemiddel

beregnet til å produsere den ønskede igangsettingen, tolerabiliteten og/eller de terapeutiske virkningene, i forbindelse med en egnet farmasøytisk eksipient (f.eks. en ampull). Det kan dessuten fremstilles mer konsentrerte doseformer, hvorfra de mer fortynnede enhetsdoseformene deretter kan produseres. De mer konsentrerte doseformene vil således inneholde vesentlig mer enn for eksempel minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere ganger mengden av anticancer-legemiddelet.

Fremgangsmåter for fremstilling av slike doseformer er kjent for fagpersoner (se for eksempel REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Doseformene inkluderer typisk et klassisk farmasøytisk bærestoff eller eksipient og kan dessuten inkludere andre medisinske midler, bærestoffer, adjuvanter, fortynningsmidler, vevsgjennomtrengingsenhancere, løsemidler og lignende. Egnede eksipienter kan skreddersys til den særlige doseform og administreringsvei ved fremgangsmåter som er velkjent i teknikken (se for eksempel *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES ovenfor).*

Eksempler på egnede eksipienter inkluderer blant annet laktose, dekstrose, sukrose, sorbitol, mannitol, stivelse, akasiegummi, kalsiumfosfat, alginater, tragakant, gelatin, kalsiumsilikat, mikrokrystallinsk cellulose, polyvinylpyrrolidon, cellulose, vann, saltløsning, sirup, metylcellulose, etylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose og polyakrylsyrer slik som karbopoler, f.eks. karbopol 941, karbopol 980, karbopol 981 osv. Doseformene kan dessuten inkludere smøremidler slik som talkum, magnesiumstearat og mineralolje, fuktemidler, emulgatorer, suspensjonsmidler, konserveringsmidler slik som metyl-, etyl- og propyl-hydroksy-benzoater (dvs. parabener), pH-justerende midler slik som uorganiske og organiske syrer og baser, søtningsstoffer og smakstilsetninger. Doseformene kan også omfatte biologisk nedbrytbare polymerkuler, dekstran og syklodekstrininklusjonskomplekser.

For oral administrering kan den terapeutisk virkningsfulle dosen være i form av tabletter, kapsler, emulsjoner, suspensjoner, løsninger, siruper, sprayer, sugetabletter, pulvere og formuleringer for varig frisetting. Egnede eksipienter for oral administrering inkluderer farmasøytiske grader av mannitol, laktose,

stivelser, magnesiumstearat, natriumsakkarin, talkum, cellulose, glukose, gelatin, sukrose, magnesiumkarbonat og lignende.

I noen utførelsesformer er den terapeutisk virkningsfulle dosen i form av en pille, tablett eller kapsel, og doseformen kan således inneholde, sammen med et anticancer-legemiddel, et hvilket som helst av følgende: et fortynningsmiddel slik som laktose, sukrose, dikalsiumfosfat og lignende, et sprengmiddel slik som stivelser eller derivater derav, et smøremiddel slik som magnesiumstearat og lignende og et bindestoff slik en stivelse, akasiegummi, polyvinylpyrrolidon, gelatin, cellulose og derivater derav. Et anticancer-legemiddel kan også formuleres til en stikkpille anbrakt for eksempel i et polyetylenglykolbærestoff (PEG).

Flytende doseformer kan fremstilles ved oppløsning eller dispersjon av et anticancer-legemiddel og eventuelt én eller flere farmasøytisk akseptable adjuvanter i et bærestoff slik som for eksempel vandig saltløsning (f.eks. 0,9 volum-% natriumklorid), vandig dekstrose, glyserol, etanol og lignende, for å danne en løsning eller suspensjon, f.eks. for oral, lokal eller intravenøs administrering. Et anticancer-legemiddel kan også formuleres til et retensjonsønem.

For lokal administrering kan den terapeutisk virkningsfulle dosen være i form av emulsjoner, lotioner, geler, skum, kremer, geler, løsninger, suspensjoner, salver og transdermale plastere. For administrering ved inhalering kan et anticancer-legemiddel tilføres som et tørt pulver eller i flytende form via en nebulisator. For parenteral administrering kan den terapeutisk virkningsfulle dosen være i form av sterile injiserbare løsninger og sterilt emballerte pulvere. Injiserbare løsninger formuleres foretrukket ved en pH på fra cirka 4,5 til cirka 7,5.

Den terapeutisk virkningsfulle dosen kan også tilveiebringes i en frysetørket form. Slike doseformer kan inkludere en buffer, f.eks. bikarbonat, for rekonstitusjon før administrering, eller bufferen kan være inkludert i den frysetørkede doseformen for rekonstitusjon med for eksempel vann. Den frysetørkede doseformen kan videre omfatte en egnet vasokonstriktor, f.eks. epinefrin. Den frysetørkede doseformen kan tilveiebringes i en sprøyte, eventuelt

pakket i kombinasjon med bufferen for rekonstitusjon, slik at den rekonstituerte doseformen umiddelbart kan administreres til en pasient.

En pasient kan også overvåkes ved periodiske tidsintervaller for å vurdere virkningen av et bestemt terapeutisk regime. Aktiveringsstatus for visse signaltransduksjonsmolekyler kan for eksempel endres basert på den terapeutiske virkningen av behandlingen med ett eller flere av anticancer-legemidlene beskrevet heri. Pasienten kan overvåkes for å vurdere responsen og forstå virkningene av bestemte legemidler eller behandlinger i en individuelt tilpasset metode. Pasienter som initialt responderer på et spesifikt anticancer-legemiddel eller kombinasjoner av anticancer-legemidler, kan dessuten bli refraktære overfor legemiddelet eller legemiddelkombinasjonen, hvilket indikerer at disse pasientene har utviklet ervervet legemiddelresistens. Disse pasientene kan fjernes fra sin nåværende behandling, og en alternativ behandling kan foreskrives i samsvar med fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen.

I visse aspekter kan fremgangsmåtene beskrevet heri anvendes sammen med paneler av genekspresjonsmarkører som predikerer sannsynligheten for brystkreftprognose og/eller tilbakefall i forskjellige populasjoner av kvinner med for eksempel lymfeknutenegativ sykdom. Disse genpanelene kan være nyttige for identifikasjon av kvinner som sannsynligvis ikke vil oppleve tilbakefall og således sannsynligvis ikke drar fordel av adjuvant kjemoterapi. Ekspresjonspanelene kan anvendes til å identifisere kvinner som med sikkerhet kan unngå adjuvant kjemoterapi, uten å påvirke resultatene for sykdomsfri og samlet overlevelse negativt. Egnede systemer inkluderer blant annet Oncotype DX™, som er et 21-geners panel fra Genomic Health, Inc., MammaPrint,®, som er et 70-geners panel fra Agendia og et 76-geners panel fra Veridex.

I visse andre aspekter kan fremgangsmåtene beskrevet heri dessuten anvendes sammen med paneler av genekspresjonsmarkører som identifiserer de opprinnelige tumorene for kreft med ukjent primærsted (CUP). Disse genekspresjonspanelene kan være nyttige for identifikasjon av kvinner med metastatisk kreft som ville dra fordel av behandling som samsvarer med den gitt til kvinner initialt diagnostisert med brystkreft. Egnede systemer inkluderer blant annet Aviara CancerTYPE ID-assayet, et RT-PCR-basert ekspresjonsassay som

måler 92 gener for å identifisere det primære opprinnelsesstedet for 39 tumortyper og Pathwork®-tester for opprinnelsesvev, som måler ekspresjonen av mer enn 1600 gener på et mikroarray og sammenligner en tumors "genekspresjonssignatur" mot dem for 15 kjente vevstyper."

IX. Eksempler

Følgende eksempler er gitt for å illustrere, men ikke begrense, oppfinnelsen ifølge kravene.

Eksempel 1. Isolering, stimulering og lysering av sirkulerende celler.

Sirkulerende celler i en fast tumor omfatter celler som enten har metastasert eller mikrometastasert fra en fast tumor og inkluderer sirkulerende tumorceller (CTC-er), kreftstamceller (CSC-er) og/eller celler som migrerer til tumoren (f.eks. sirkulerende endoteliale 88-progenitorceller (CEPC-er), sirkulerende endotelceller (CEC-er), sirkulerende pro-angiogene myeloide celler, sirkulerende dendrittiske celler osv). Pasientprøver inneholdende sirkulerende celler kan oppnås fra et hvilket som helst tilgjengelig biologisk fluid (f.eks. fullblod, serum, plasma, duktalt lavagefluid, brystvorteaspirat, lymfe, urin, saliva, finnålsaspirat osv). De sirkulerende cellene kan isoleres fra en pasientprøve ved hjelp av én eller flere separasjonsfremgangsmåter, slik som for eksempel immunmagnetisk separasjon (se for eksempel Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589–4594 (1998), Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577–582 (2001)), CellTrack™-systemet fra Immunicon (Huntingdon Valley, PA), mikrofluidisk separasjon (se for eksempel Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251–256 (2004), Lin et al., Abstract No. 5147, 97. årsmøte i AACR, Washington, D.C. (2006)), FACS (se for eksempel Mancuso et al., Blood, 97:3658–3661 (2001)), densitetgradientsentrifugering (se for eksempel Baker et al., Clin. Cancer-Res., 13:4865–4871 (2003)) og nedbrytingsfremgangsmåter (se for eksempel Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521–530 (2002)).

<u>Manuell isolering av CTC-er:</u>

Immunmagnetisk separasjon av CTC-er – manuell isolering etterfulgt av et aktiveringsassay:

1) Det anvendes magnetkuler (Dynal M450; Dynal AS; Oslo, Norge) som tidligere er konjugert til et monoklonalt anti-EpCAM-antistoff (Kordia Life Sciences; Leiden, Nederland). Det kan alternativt anvendes polyklonale antistoffer eller blandinger av monoklonale antistoffer.
2) Umiddelbart før anvendelse vaskes de forhåndsovertrukne Dyna-kulene én gang i likt volum av PBS med BSA ved 0,01 %.
3) 25 µl av de forhåndsovertrukne Dyna-kulene tilsettes til 1 ml av prøven.
4) Blandingen inkuberes i 20 minutter ved 2–8 °C med svak vipping og rotering.
5) Glasset plasseres i den magnetiske separatoren (MPL-1 magnet) i 2 minutter.
6) Supernatanten forkastes, og de kulebundne cellene vaskes tre ganger ved resuspendering i PBS med BSA ved 0,01 % etterfulgt av magnetisk separasjon.
7) Prøven resuspenderes i 100 µl stimuleringsbuffer.

Prøvefremstilling:
1) Perifert blod fra humane pasienter tappes i et silikonbelagt glass inneholdende 1 mg/ml EDTA. De første 3–5 ml forkastes for å unngå kontaminasjon med epitelceller frisatt fra den punkterte venen.
2) 1 ml fullblod fortynnes 1 : 3 med 0,9 % NaCl før anvendelse.

Kontrollfremstilling:
1) Cellelinjekontroller fremstilles ved spiking av humane kreftcellelinjer inn i HL-60-celler.
2) Cellelinjekontroller fremstilles ved spiking av humane kreftcellelinjer inn i fullblod fra friske donorer.

<u>Manuell isolering av CEC-er og CEPC-er:</u>

Som et ikke-begrensende eksempel kan levedyktige CEC-er og CEPC-er isoleres ved hjelp av den immunmagnetiske isolerings-/anrikningsteknikken beskrevet i Beerepoot et al., Ann. Oncology, 15:139–145 (2004). Perifert blod inkuberes kort fortalt med magnetkuler (Dynal M450 IgG_1) som er tidligere konjugert til et monoklonalt anti-CD146-antistoff (Kordia Life Sciences). Dette antistoffet gjenkjenner all lineage av endotelceller, men ikke hematopoetiske celler eller epitelceller, i perifert blod (George et al., J. Immunol. Meth., 139:65–75 (1991)). Negativ seleksjon av hematopoetiske celler og epitelceller kan anvendes før den positive seleksjonen med magnetkuler som er konjugert til

egnede antistoffer (f.eks. Dynal-CD45-kuler for nedbryting av leukocytter, Dynal-CD14-kuler for nedbryting av monocytter, Dynal-EpCAM for nedbryting av epitelceller (Invitrogen; Carlsbad, CA)). I dette eksempelet er det bare anvendt positiv seleksjon.

Immunmagnetisk separasjon av CEC-er og CEPC-er – manuell isolering etterfulgt av et aktiveringsassay:

1) Det anvendes magnetkuler (Dynal M450) som er tidligere konjugert til et monoklonalt anti-CD146-antistoff (Kordia Life Sciences).

2) Umiddelbart før anvendelse vaskes de forhåndsovertrukne Dyna-kulene én gang i likt volum av PBS med BSA ved 0,01 %.

3) 25 µl forhåndsovertrukne Dyna-kuler tilsettes til 1 ml av prøven.

4) Blandingen inkuberes i 20 minutter ved 2–8 °C med svak vipping og rotering.

5) Glasset plasseres i den magnetiske separatoren (MPL-1 magnet) i 2 minutter.

6) Supernatanten forkastes, og de kulebundne cellene vaskes tre ganger ved resuspendering i PBS med BSA ved 0,01 % etterfulgt av magnetisk separasjon.

7) Prøven resuspenderes i 100 µl stimuleringsbuffer.

Prøvefremstilling:

1) Perifert blod fra humane pasienter tappes i et silikonbelagt glass inneholdende 1 mg/ml EDTA. De første 3–5 ml forkastes for å unngå kontaminasjon med endotelceller frisatt fra den punkterte venen.

2) 1 ml fullblod fortynnes 1 : 3 med 0,9 % NaCl før anvendelse.

Kontrollfremstilling:

1) Cellelinjekontroller fremstilles ved spiking av humane endotelceller fra umbilikalvenen (HUVEC) inn i HL-60-celler.

2) Cellelinjekontroller fremstilles ved spiking av humane endotelceller fra umbilikalvenen (HUVEC) inn i fullblod som er gitt fra friske personer.

<u>Manuell isolering av CEPC-er (uten CEC-er):</u>

CEPC-er er en sirkulerende undertype av benmargavledede progenitorceller som har evne til å differensiere til modne endotelceller som respons på forskjellige angiogene vekstfaktorer. CEPC-er kan isoleres ved seleksjon med antistoffer som gjenkjenner overflatemarkøren CD34. CD133 er en overflatemarkør som

differensierer umodne endoteliale progenitorceller (EPC-er) eller primitive hematopoetiske stamceller (HSC-er) fra CEPC-er. Forskjellige isoleringsfremgangsmåter for CEPC-er fra forskjellige kilder er beskrevet ved hjelp av adherenskultur eller magnetiske mikrokuler. I dette eksempelet anvendes det en protokoll modifisert fra den beskrevet i Asahara et al., Science, 275:964–967 (1997).

Immunmagnetisk separasjon av CEPC-er – manuell isolering etterfulgt av et aktiveringsassay:

1) Det anvendes magnetkuler (Dynal M450 CD34). Disse kulene overtrekkes med et monoklonalt antistoff som er spesifikt for overflateantigenet CD34.

2) Umiddelbart før anvendelse vaskes de forhåndsovertrukne Dyna-kulene én gang i likt volum av PBS med BSA ved 0,01 %.

3) 25 µl forhåndsovertrukne Dyna-kuler tilsettes til 1 ml av prøven.

4) Blandingen inkuberes i 20 minutter ved 2–8 °C med svak vipping og rotering.

5) Glasset plasseres i den magnetiske separatoren (MPL-1 magnet) i 2 minutter.

6) Supernatanten forkastes, og de kulebundne cellene vaskes tre ganger ved resuspendering i PBS med BSA ved 0,01 % etterfulgt av magnetisk separasjon.

7) Prøven resuspenderes i 100 µl stimuleringsbuffer.

Prøvefremstilling:

1) Perifert blod fra humane pasienter tappes i et silikonbelagt glass inneholdende 1 mg/ml EDTA. De første 3–5 ml forkastes for å unngå kontaminasjon med endotelceller frisatt fra den punkterte venen.

2) 10 ml blod fortynnes 1 : 1 med en balansert saltløsning.

3) 4 ml fortynnet blod legges sjiktvis på 3 ml Ficoll-Paque i 10 ml glass.

4) Glassene roteres ved 400 x g i 30–40 min ved 18–20 °C.

5) Det øvre sjiktet inneholdende plasma og blodplater tappes av ved hjelp av en steril Pasteur-pipette og lar sjiktet av mononukleære celler ligge uforstyrret igjen ved kontaktflaten.

6) De mononukleære cellene overføres til et sterilt sentrifugeglass ved hjelp av en steril pipette.

7) Det tilsettes 6 ml balansert saltløsning, og cellene resuspenderes forsiktig.

8) Blandingen sentrifugeres ved 60–100 x g i 10 min ved 18–20 °C.

9) Supernatanten fjernes, og de mononukleære cellene fra hvert glass resuspenderes i 1 ml PBS.

Celleisolering av CTC-er, CEC-er og CEPC-er ved hjelp av Veridex-systemet:

Veridex, LLC (Warren, NJ) har markedsført CellSearch-systemet, som består av CellTracks® AutoPrep®-systemet, CellSearch™-epitelcellekitet og CellTracks®-analysatoren. CellTracks® AutoPrep®-systemet er et halv-automatisk prøvefremstillingssystem (Kagan et al., J. Clin. Ligand Assay, 25:104–110(2002)). CellSearch™-epitelcellekitet består av: ferrofluider overtrukket med anti-EpCAM-antistoffer som er spesifikke for epitelceller, fykoerytrinkonjugerte antistoffer mot cytokeratin 8, 18 og 19, et anti-CD45-antistoff konjugert til allofykocyanin, DAPI-fargestoff og buffere for vasking, permeabilisering og resuspendering av cellene. Protokollen som anvendes i dette eksempelet, er også beskrevet i Allard et al., Clin. Cancer Res., 10:6897–6904 (2004). Hele Veridex-systemet kan anvendes til CTC-telling eller, ved manuell fjerning av prøven etter isolering med CellTracks® AutoPrep®-systemet, kan tilveiebringe en fremgangsmåte for isolering før analyse for signalveiaktivering. Antallet av CTC-er kan være informativt for algoritmeutvikling.

Veridex-system – CTC-anriking etterfulgt av telling:

1) 7,5 ml blod blandes med 6 ml buffer, sentrifugeres ved 800 x g i 10 minutter og plasseres deretter på CellTracks® AutoPrep®-systemet.

2) Etter at instrumentet har aspirert supernatanten, tilsetter instrumentet ferrofluidene.

3) Instrumentet utfører inkuberingen og det etterfølgende trinnet for magnetisk separasjon.

4) Ubundne celler og det resterende plasmaet aspireres.

5) Fargingsreagenser tilsettes sammen med permeabiliseringsbufferen for fluorescensfarging.

6) Etter inkubering med systemet separeres cellene igjen magnetisk og resuspenderes i MagNest®-cellepresentasjonsanordningen.

7) MagNest®-cellepresentasjonsanordningen plasseres deretter på CellTracks®-analysatoren, et halvautomatisert fluorescensmikroskop med fire farger.

8) Det tas bilder som oppfyller de Veridex-definerte kriteriene, og de vises i en nettleser for endelig manuelt valg.

9) Resultatene av celletellingen uttrykkes som antallet av celler per 7,5 ml blod.

Veridex-system – CTC-anriking etterfulgt av et aktiveringsassay:
1) 7,5 ml blod blandes med 6 ml buffer, sentrifugeres ved 800 x g i 10 minutter og plasseres deretter på CellTracks® AutoPrep®-systemet.
2) Etter at instrumentet har aspirert supernatanten, tilsetter instrumentet ferrofluidene.
3) Instrumentet utfører inkuberingen og det etterfølgende trinnet for magnetisk separasjon.
4) Ubundne celler og det resterende plasmaet aspireres.
5) Prøven resuspenderes i 100 µl stimuleringsbuffer.

Veridex-system – CEC- og CEPC-anriking etterfulgt av et aktiveringsassay:
1) Veridex tilbyr et CellSearch™-endotelcellekit som anvender innfanging med et anti-CD146-antistoff. CellSearch™-endotelcellekitet anvendes i sammenheng med CellTracks® AutoPrep®-systemet for blodprøvefremstilling og CellTracks®-analysatoren for å telle og karakterisere CEC-er og CEPC-er fra fullblod. Protokollen er den samme som for CellSearch™-epitelcellekitet.

Prøvefremstilling:
1) Telling: Perifert blod fra humane pasienter tappes i CellSave-konserveringsglass ifølge produsentens anvisninger. De første 3–5 ml forkastes for å unngå kontaminasjon med epitel- eller endotelceller frisatt fra den punkterte venen.
2) Signalveianalyse: Perifert blod fra humane pasienter tappes i et silikonbelagt glass inneholdende 1 mg/ml EDTA. De første 3–5 ml forkastes for å unngå kontaminasjon med epitel- eller endotelceller frisatt fra den punkterte venen.

<u>Manuell isolering av CSC-er:</u>

Det kommer stadig mer materiale som tyder på at tumorer inneholder en liten populasjon av antatte kreftstamceller med unike selvfornyelses- og overlevelsesmekanismer (se for eksempel Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28 (2004), Reya et al., Nature, 414:105–111 (2001), Dontu et al., Trends Endocrinol. Metal., 15:193–197 (2004) og Dick, Nature, 423:231–233 (2003)). Kreftstamceller (CSC-er) kan forekomme i en slumretilstand over lengre tid, hvilket gjør dem resistente overfor kjemoterapeutiske legemidler som retter seg

mot celler som deler seg. Denne kreftinitierende populasjonen kan karakteriseres for aktivering av selvfornyelses- og overlevelsessignalveier som utsettes for målrettet behandling for selektiv fjerning. Fremgangsmåter for isolering av CSC-er er beskrevet ved hjelp av adherenskultur eller magnetiske mikrokuler. I dette eksempelet anvendes det en protokoll modifisert fra den beskrevet i Cote et al., Clin. Can. Res., 12:5615 (2006).

Immunmagnetisk CSC-isolering – manuell isolering etterfulgt av et aktiveringsassay:

1) Det anvendes magnetkuler (Dynal AS; Oslo, Norge). Disse kulene overtrekkes med et monoklonalt antistoff som er spesifikt for enten overflateantigenet CD34 eller CD133.

2) Umiddelbart før anvendelse vaskes de forhåndsovertrukne Dyna-kulene én gang i likt volum av PBS med BSA ved 0,01 %.

3) $1–10^7$ forhåndsovertrukne Dyna-kuler tilsettes til 3 ml av prøven.

4) Blandingen inkuberes i 60 minutter ved 2–8 °C med svak vipping og rotering.

5) Blandingen deles i 1 ml porsjoner, og hvert glass plasseres i den magnetiske separatoren (MPL-1 magnet) i minst 6 minutter.

6) Supernatanten forkastes, og de kulebundne cellene vaskes tre ganger ved resuspendering i PBS med BSA ved 0,01 % etterfulgt av magnetisk separasjon.

7) Prøven resuspenderes i 100 µl stimuleringsbuffer.

Prøvefremstilling:

1) Det tas benmargsprøver av pasienter med tidlig brystkreft etter pasientgodkjenning.

2) Benmargsaspiratene prosesseres som beskrevet i Bauer et al., Clin. Can. Res., 6:3552–3559 (2000)). Den mononukleære cellefraksjonen inneholdende hvilke som helst disseminerte tumorceller anrikes ved Ficoll-Hypaque-densitetgradientsentrifugering ved hjelp av en Beckman GS-6-sentrifuge ved 4000 x g i 35 minutter og vaskes to ganger med PBS.

<u>Cellestimulering og lysering av isolerte CTC-er:</u>

Cellestimulering:

1) Vekstfaktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling:
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter med TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Stimulerte CTC-er lyseres ved hjelp av følgende protokoll:
1) Fersk lyseringbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3.
2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.
3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.
4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.
5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved -80 °C.

Tabell 3

Lyseringbufferoppskrift (10 ml)			
Reagenser	Stamkons.	Sluttkons.	Volum
10 % Triton X-100	10	1	1,00
1 M Tris, pH 7,5	1	0,05	0,05
1 M NaF	1	0,05	0,05
5 M NaCl	5	0,1	0,20
2 M B-glycerolfosfat	1	0,05	0,50
0,1 M Na_3 VO_4	0,1	0,001	0,10
1 mg/ml pepstatin	1	0,10	
Complete-miniprotease			1 tablett

Lyseringbufferoppskrift (10 ml)			
Reagenser	Stamkons.	Sluttkons.	Volum
0,5 M EDTA	0,5	0,005	0,10
		Total (ml)	3,00
		Vann (ml)	7,00

Cellestimulering og lysering av isolerte CEC-er og/*eller *CEPC-er:

VEGF er ment å fremme overlevelse ved aktivering av antiapoptotiske signalveier i både CEPC-er (Larrivee et al., J. Biol. Chem., 278:22006–22013 (2003)) og modne CEC-er som er blitt skrellet av karveggen (Solovey et al., Blood, 93:3824–3830 (1999)). VEGF kan også stimulere spredning av CEPC-er eller modne CEC-er, selv om modne CEC-er bare ser ut til å ha en begrenset proliferativ kapasitet sammenlignet med CEPC-er (Lin et al., J. Clin. Invest., 105:71–77 (2000)). CEC-er og/eller CEPC-er aktiveres derfor ved inkubering med VEGF-familievekstfaktorer før lysering.

Cellestimulering:
1) Vekstfaktorene VEGF, FGF, PDGF, PIGF og/eller Ang, hver ved 100 nM, tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling:
1) Prøven inkuberes med Avastin-, Nexavar-, Sutent- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene VEGF, FGF, PDGF, PIGF og/eller Ang, hver ved 100 nM, og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):
1) Prøven inkuberes med Avastin-, Nexavar-, Sutent- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av VEGF, FGF, PDGF, PIGF og/eller Ang, hver ved 100 nM, og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Isolerte CEC-er og/eller CEPC-celler lyseres ved hjelp av følgende protokoll:
1) Fersk lyseringbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3.

2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.
3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.
4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.
5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved –80 °C.

Cellestimulering og lysering av isolerte CSC-er:

Stimulerte celler:
1) Vekstfaktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Stimulerte celler med legemiddelbehandling:
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Stimulerte celler med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Isolerte CSC-celler lyseres ved hjelp av følgende protokoll:
1) Fersk lyseringbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3.
2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.
3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.
4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.
5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved –80 °C.

Eksempel 2. Fremstilling av tumorcelleekstrakter fra vev, biopsi eller primære kulturer.

Dette eksempelet illustrerer fremgangsmåter for isolering, stimulering og lysering av celler fra tumorvev eller biopsiprøver. Dette eksempelet illustrerer også fremgangsmåter for initiering, stimulering og lysering av primære kulturer av tumorceller isolert fra vev, biopsi eller fullblod. Ytterligere fremgangsmåter for isolering og dyrking av tumorceller fra biologiske prøver for screening av kjemoterapeutiske midler er beskrevet i for eksempel US-patent nr. 5 728 541, 6 416 967, 6 887 680, 6 900 027, 6 933 129 og 7 112 415 og i US-patentpublikasjon nr. 20040023375 og 20050202411. De cellulære ekstraktene fremstilt i samsvar med dette eksempelet kan anvendes i enkeltdeteksjons- eller proksimitetsassayene beskrevet heri.

Isolering av tumorceller fra primært eller metastatisk vev:

Celleisolering og -kultur:

1) Cirka 5–100 mg ikke-nekrotisk, ikke-kontaminert tumorvev høstes kirurgisk og plasseres i 100 ml flaske inneholdende sterile cellekulturmedier (f.eks. RMPI-1640 med 10 % FBS og antibiotika).

2) Prøvene kan oppbevares eller transporteres ved romtemperatur innen 72 timer etter ekstraksjon.

3) Prøvene skylles tre ganger i cellekulturmedier.

4) Vevet skjæres opp i små biter med en skalpell og disaggregeres deretter i en cellesuspensjon ved passering gjennom en finmasket duk.

5) Oppskåret vev behandles alternativt med en blanding inneholdende 0,25 % kollagenase II og 0,001 % DNase fortynnet i serumfrie cellekulturmedier inneholdende antibiotika. Inkuberingen foregår i 15–20 min under forsiktig omrøring. Enzymene fjernes etter behandlingen ved vasking 3 ganger med cellekulturmedier.

6) Cellekonsentrasjonen justeres til 10^6/ml, og cellene utsås på 6-brønners plater og sedimenteres over natten. Neste dag trypsiniseres cellene og utsås på nytt på mikrotiterplater for stimulering med ligander og/eller inhibering med målrettede legemidler.

Cellestimulering og lysering av celler fra disaggregerte tumorer:

Cellestimulering:

1) Vekstfaktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling:
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter med TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Stimulerte celler lyseres ved hjelp av følgende protokoll:
1) Fersk lyseringsbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3 ovenfor.
2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.
3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.
4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.
5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved –80 °C.

<u>Isolering av tumorceller fra biopsiprøver:</u>

Celleisolering og -kultur:
1) Kjernebiopsier ekstraheres kirurgisk (2 kjerner for 14 gauge nåler, 3 kjerner for 16 gauge nåler og 4 kjerner for 18 gauge nåler, med 1–2 biopsier for vakuumassisterte biopsier) og plasseres på et 10 ml sterilt glass inneholdende cellekulturmedier som for tumorprøver.
2) Prøvene kan oppbevares eller transporteres ved romtemperatur innen 72 timer etter ekstraksjon.
3) Cellulært materiale fra kjernebiopsier disaggregeres til en cellesuspensjon ved passering gjennom en finmasket duk.

4) Biopsier kan alternativt behandles med en blanding inneholdende 0,25 % kollagenase II og 0,001 % DNase fortynnet i cellekulturmedier inneholdende antibiotika. Inkuberingen foregår i 15–20 min under forsiktig omrøring. Enzymene fjernes etter behandlingen ved vasking 3 ganger med cellekulturmedier.

5) Cellekonsentrasjonen justeres til 10^6/ml, og cellene utsås på 6-brønners plater og sedimenteres over natten. Neste dag trypsiniseres cellene og utsås på nytt på mikrotiterplater for stimulering med ligander og/eller inhibering med målrettede legemidler.

<u>Cellestimulering og lysering av celler fra biopsier:</u>

Cellestimulering:

1) Vekstfaktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling:

1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.

2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):

1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.

2) Cellene stimuleres deretter med TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Stimulerte celler lyseres ved hjelp av følgende protokoll:

1) Fersk lyseringsbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3 ovenfor.

2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.

3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.

4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.

5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved –80 °C.

Initiering av primære kulturer fra tumorceller isolert fra vev, biopsi eller fullblod:

Cellekultur:
1) Tumorceller isolert fra vev, biopsi eller fullblod som beskrevet ovenfor dyrkes i små, sterile flasker (f.eks. T-25), petriskål (f.eks. 10 mm) eller plater (f.eks. 24-brønners plater) avhengig av antallet isolerte tumorceller.
2) Inkuberingen utføres i cellekulturmedier (f.eks. RMPI-1640 med 2 % FBS og antibiotika) i en fuktet 37 °C inkubering supplert med 5 % CO_2. Over tid danner cellene et monosjikt på bunnen av karet og begynner å dele seg. Når cellene er nær konfluens, trypsiniseres de og utsås på nytt på mikrotiterplater for stimulering med ligander og/eller inhibering med målrettede legemidler.

Cellestimulering og lysering av primære kulturer fra tumorceller isolert fra vev, biopsi eller fullblod:

Cellestimulering:
1) Vekstfaktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) tilsettes til cellene og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling:
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter ved tilsetning av faktorene TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 5 minutter.

Cellestimulering med legemiddelbehandling (reguleringssløyfe):
1) Prøven inkuberes med Herceptin-, Lapatinib-, Tarceva- og/eller Rapamycin-analoger ved terapeutisk virkningsfulle konsentrasjoner i 30 min ved 37 °C.
2) Cellene stimuleres deretter med TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) og/eller IGF (100 nM) og inkuberes ved 37 °C i 120 minutter.

Stimulerte celler lyseres ved hjelp av følgende protokoll:
1) Fersk lyseringsbuffer nylages ved blanding av reagensene angitt i tabell 3 ovenfor.

2) Etter sluttvasken resuspenderes cellene på is i 100 µl kjølt buffer.
3) Inkuberingen utføres på is i 30 minutter.
4) Blandingen roteres i en mikrofuge ved høyeste hastighet i 10 minutter for å separere kulene fra lysatet.
5) Lysatet overføres til et nytt glass for assay eller oppbevaring ved -80 °C.

Eksempel 3. Enkeltdeteksjonsmikroarray-ELISA med tyramidsignalamplifikasjon.

Dette eksempelet illustrerer et multiplekset enkeltdeteksjonsmikroarray-ELISA med høy gjennomstrømning og forbedret dynamisk område som er egnet til å analysere aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler i sjeldne sirkulerende celler:
1) Innfanget antistoff ble skrevet på en 16-felters FAST-plate (Whatman Inc.; Florham Park, NJ) med en 2 ganger seriefortynning.
2) Etter tørking over natten ble platen blokkert med Whatman-blokkeringsbuffer.
3) 80 µl cellelysat ble tilsatt på hvert felt med en 10 ganger seriefortynning. Platen ble inkubert i to timer ved romtemperatur.
4) Etter seks vask med TBS-Tween ble 80 µl biotinmerket deteksjonsantistoff (f.eks. et monoklonalt antistoff som gjenkjenner p-EGFR, eller et monoklonalt antistoff som gjenkjenner EGFR uavhengig av aktiveringsstatus) inkubert i to timer ved romtemperatur.
5) Etter seks vask ble streptavidinmerket pepperrotperoksidase (SA-HRP) tilsatt og inkubert i 1 time for å la SA-HRP binde til det biotinmerkede deteksjonsantistoffet.
6) For signalamplifikasjon ble 80 µl biotintyramid ved 5 µg/ml tilsatt og omsatt i 15 minutter. Platen ble vasket seks ganger med TBS-Tween, to ganger med 20 % DMSO/TBS-Tween og én gang med TBS.
7) 80 µl SA-Alexa 555 ble tilsatt og inkubert i 30 minutter. Platen ble deretter vasket to ganger, tørket i 5 minutter og skannet på en mikroarrayscanner (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

Eksempel 4. Proksimitetsmikroarray-ELISA med tyramidsignalamplifikasjon.

Dette eksempelet illustrerer et multiplekset proksimitetsdeteksjonsmikroarray-ELISA med høy gjennomstrømning og forbedret dynamisk område som er egnet til å analysere aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler i sjeldne sirkulerende celler:

1) Innfanget antistoff ble skrevet på en 16-felters FAST-plate (Whatman Inc.) med en seriefortynning i området fra 1 mg/ml til 0,004 mg/ml.

2) Etter tørking over natten ble platen blokkert med Whatman-blokkeringsbuffer.

3) 80 µl A431-cellelysat ble tilsatt på hvert felt med en 10 ganger seriefortynning. Platen ble inkubert i to timer ved romtemperatur.

4) Etter seks vask med TBS-Tween ble det til platene tilsatt 80 µl deteksjonsantistoffer for proksimitetsassayet fortynnet i TBS-Tween / 2 % BSA / 1 % FBS. De anvendte deteksjonsantistoffene var: (1) et monoklonalt anti-EGFR-antistoff som var direkte konjugert til glukoseoksidase (GO), og (2) et monoklonalt antistoff som gjenkjenner fosforylert EGFR som var direkte konjugert til pepperrotperoksidase (HRP). Inkuberingen var i 2 timer ved romtemperatur.

5) Deteksjonstrinnet benyttet alternativt et biotinkonjugat av det monoklonale antistoffet som gjenkjenner fosforylert EGFR. I disse tilfellene ble det etter seks vask inkludert et ytterligere sekvensielt trinn for inkubering med streptavidin-HRP i 1 time.

6) Deteksjonstrinnet benyttet alternativt et oligonukleotidmediert glukoseoksidasekonjugat (GO) av anti-EGFR-antistoffet. Det ble anvendt enten det direkte konjugerte eller det biotinsteptavidinbundne (SA) konjugatet av HRP til det fosforylerte EGFR-antistoffet.

7) For signalamplifikasjon ble 80 µl biotintyramid ved 5 µg/ml tilsatt og omsatt i 15 min. Platen ble vasket seks ganger med TBS-Tween, to ganger med 20 % DMSO/TBS-Tween og én gang med TBS.

8) 80 µl SA-Alexa 555 ble tilsatt og inkubert i 30 min. Platen ble deretter vasket to ganger, tørket i 5 minutter og skannet på en mikroarrayskanner (Perkin-Elmer, Inc.).

Figur 2 illustrerer én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen hvor proksimitetsassayene beskrevet heri detekterte fosforylert EGFR (pEGFR) og fosforylert HER-2 (pHER-2) med enkeltcellesensitivitet. Figur 3 viser at proksimitetsassayene beskrevet heri resulterte i svært spesifikke assayer for detektering av HER-2 på enkeltcellenivå bare i celler som uttrykker HER-2.

Eksempel 5. Generering av aktiveringsprofiler for legemiddelvalg.

Fremgangsmåtene og sammensetningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til valg av legemiddel for kreftbehandling. En typisk protokoll innebærer generering av to profiler, én referanseaktiveringsprofil og én testaktiveringsprofil, hvilke deretter sammenlignes for å bestemme virkningen av et særlig legemiddelbehandlingsregime (se figur 4).

Referanseaktiveringsprofil

For å avlede en referanseaktiveringsprofil tas det en blodprøve av en pasient med en spesifikk krefttype (f.eks. brysttumor) før behandling med anticancer-legemiddel. Sjeldne sirkulerende celler avledet fra den kreftfremkallende tumoren isoleres fra blodprøven ved hjelp av for eksempel immunmagnetiske separasjonsteknikker som beskrevet nærmere heri. De isolerte sirkulerende cellene kan stimuleres *in vitro* med én eller flere vekstfaktorer. De stimulerte cellene lyseres deretter for å produsere en cellulær ekstrakt. Den cellulære ekstrakten anvendes på et adresserbart array inneholdende en fortynningsserie av et panel av innfangingsantistoffer som er spesifikke for signaltransduksjonsmolekyler hvis aktiveringsstatus kan være endret i pasientens krefttype. Enkeltdeteksjons- eller proksimitetsassayer utføres ved hjelp av de egnede deteksjonsantistoffene (f.eks. aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og/eller aktiveringsstatusavhengige antistoffer) til å bestemme aktiveringsstatus for hvert aktuelt signaltransduksjonsmolekyl. Tabellen for valg av signalvei (tabell 2) er særlig nyttig for å velge hvilken aktiveringsstatus som skal detekteres basert på pasientens krefttype. En pasient kan for eksempel ha en krefttype som viser aktiveringsstatus for EGFR-signalveien angitt i "Signalvei 1" i tabell 2. En annen pasient kan alternativt ha en annen krefttype som viser aktiveringsstatus for EGFR-signalveien angitt i "Signalvei 2" i tabell 2. Det genereres således en referanseaktiveringsprofil som gir aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekyler i pasientens kreft under fravær av hvilke som helst anticancer-legemidler.

Testaktiveringsprofil

For å oppnå en testaktiveringsprofil tas det en andre blodprøve av pasienten med den spesifikke krefttypen (f.eks. brysttumor) enten før behandling med anticancer-legemiddel eller etter administrering av et anticancer-legemiddel (f.eks. på et hvilket som helst tidspunkt i løpet av kreftbehandlingen). Sjeldne sirkulerende celler avledet fra den kreftfremkallende tumoren isoleres fra blodprøven. Hvis det oppnås isolerte celler fra en pasient som ikke har mottatt behandling med et anticancer-legemiddel, inkuberes de isolerte cellene med anticancer-legemidler som retter seg mot ett eller flere av de aktiverte signaltransduksjonsmolekylene som bestemmes fra referanseaktiveringsprofilen beskrevet ovenfor. Tabellen for valg av legemiddel (tabell 1) er særlig nyttig for valg av egnede anticancer-legemidler som enten er godkjent eller befinner seg i kliniske utprøvinger som inhiberer spesifikke aktiverte målsignaltransduksjonsmolekyler. Hvis det for eksempel bestemmes ut fra referanseaktiveringsprofilen at EGFR aktiveres, kan cellene deretter inkuberes med ett eller flere av legemidlene angitt i kolonne "A" eller "B" i tabell 1. De isolerte cellene kan deretter stimuleres *in vitro* med én eller flere vekstfaktorer. De isolerte cellene lyseres deretter for å produsere en cellulær ekstrakt. Den cellulære ekstrakten anvendes på det adresserbare arrayet, og det utføres proksimitetsassayer for å bestemme aktiveringsstatus for hvert aktuelt signaltransduksjonsmolekyl. Det genereres således en testaktiveringsprofil for pasienten som gir aktiveringsstatus for signaltransduksjonsmolekylene i pasientens kreft under nærvær av spesifikke anticancer-legemidler.

Legemiddelvalg

Anticancer-legemidlene vurderes å være egnet eller uegnet til behandling av pasientens kreft ved sammenligning av testaktiveringsprofilen med referanseaktiveringsprofilen. Hvis for eksempel legemiddelbehandling får de fleste eller alle signaltransduksjonsmolekylene til å være vesentlig mindre aktivert enn under fravær av legemidlene, f.eks. en endring fra sterk aktivering uten legemidlene til svak eller svært svak aktivering med legemidlene, vurderes behandlingen deretter å være egnet til pasientens kreft. I slike tilfeller initieres enten behandling med det egnede anticancer-legemiddelet hos en pasient som ikke har mottatt legemiddelbehandling, eller etterfølgende behandling fortsettes med det egnede anticancer-legemiddelet hos en pasient som allerede mottar legemiddelet. Hvis legemiddelbehandlingen imidlertid anses som uegnet til

behandling av pasientens kreft, velges det andre legemidler som anvendes til å generere en ny testaktiveringsprofil, hvilken deretter sammenlignes med referanseaktiveringsprofilen. I slike tilfeller initieres enten behandling med et egnet anticancer-legemiddel hos en pasient som ikke har mottatt legemiddelbehandling, eller etterfølgende behandling endres til et egnet anticancer-legemiddel hos en pasient som allerede mottar det uegnede legemiddelet.

Eksempel 6. Adresserbare arrayer for analyse av aktiverte reseptortyrosinkinaser

Figur 5 illustrerer et eksempel på adresserbart reseptortyrosinkinasearray ifølge oppfinnelsen. Som drøftet heri er reseptortyrosinkinaser sentrale komponenter i mange signaltransduksjonsveier som er involvert i cellespredning. ErbB-familien av reseptortyrosinkinaser har for eksempel fire familiemedlemmer og spiller en viktig rolle i grunnleggende celleprosesser som cellespredning, -differensiering og -overlevelse. Denne familien av reseptortyrosinkinaser har vært rapportert som overuttrykt ved en rekke forskjellige krefttyper og er assosiert med dårligere klinisk resultat. Ved vekstfaktorbinding homo- og heterodimeriserer ErbB1/EGFR, ErbB3/HER-3 og ErbB4/HER-4 for å aktivere en rekke forskjellige signalveier. ErbB2/HER-2 binder ikke til en vekstfaktor og er den foretrukne heterodimeriseringspartneren for alle de tre familiemedlemmene. ErbB2 kan også homodimerisere når det er overuttrykt, og aktivere signalveier. Homo- eller heterodimerisering av ErbB-familien resulterer i transfosforylering. Auto- eller transfosforylering letter den inhiberende konformasjonen av reseptortyrosinkinaser, hvilket sikrer full kinaseaktivering og samtidig skaper bindingssteder for en rekke SH2-holdige signaleringsmolekyler, slik som Src, Shc, SHP-1, SHEP-1 og PI3K. Adapterproteiner eller signaliseringsproteiner som Shc, Grb2 eller PI3K rekrutteres til de fosforylerte reseptorene. Fosforylering av adapterproteinene resulterer i aktivering av MAPK- og Akt-signalveiene. MAPK-signalveiaktivering kan evalueres ved bestemmelse av fosforyleringsstatus for Erk og Rsk, mens PI3K-signalveiaktivering kan evalueres ved bestemmelse av fosforyleringsstatus for Akt og p70S6K.

Det adresserbare arrayet vist på figur 5 gir således ikke bare mulighet for å bestemme ekspresjonen av ErbB-familien av reseptortyrosinkinaser, men også

deres aktiveringsstatus. Både MAPK- og PI3K/Akt-signalveiaktivering kan også studeres på den adresserbare brikken. Ekspresjonen og/eller aktiveringsstatus for nukleære hormonreseptorer slik som ER (østrogenreseptor) og PR (progesteronreseptor) og andre proteiner slik som NCOR (nukleær reseptorkorepressor), AIB1 (amplifisert i brystkreft-1), IGF-IR, cMET, Ki67 og TOPO II kan dessuten studeres på den adresserbare brikken. Et annet trekk ved brikken er forekomst av internkontroller for å bestemme tumorens eller den tumorassosierte cellens (CEC-er, CEP-er, pericytter osv.) innhold og ikke-spesifikt IgG for å bestemme en hvilken som helst ikke-spesifikk binding.

Eksempel 7. Adresserbare arrayer for analyse av signaltransdukjonsveier ved angiogenese.

Figur 6 og 7 illustrerer konfigurasjonen av adresserbare arrayer for bestemmelse av aktiveringsstatus for signaltransduksjonskomponenter som er involvert i angiogenese. Som beskrevet heri er tumorangiogenese avgjørende for vekst av mange faste tumorer. De viktigste anbrakte signaltransduksjonsmolekylene inkluderer medlemmer av VEGFR-, FGFR- og TIE-familien av reseptortyrosinkinaser, som hovedsakelig er uttrykt på endotelceller. PDGFR er typisk uttrykt på pericytter. Ekspresjonen og aktiveringsstatus for disse reseptorene er avgjørende for bestemmelse av den predominante angiogenesemekanismen i individuelle tumorprøver. Vekstfaktorer som VEGF og PIGF binder til VEGFR-1 og VEGFR-2 og initierer homo- og heterodimerisering. Dimerisering etterfølges av fosforylering av disse reseptorene, hvilket i sin tur etterfølges av aktivering av MAPK- og PI3K/Akt-signalveiene. FGFR-, TIE- og PDGFR-reseptorer aktiveres også på lignende måte. Auto- eller transfosforylering letter den inhiberende konformasjonen av reseptortyrosinkinaser, hvilket sikrer full kinaseaktivering og samtidig skaper bindingssteder for en rekke SH2-holdige signaleringsmolekyler, slik som Src, Shc, SHP-1, V-kadherin, SHEP-1 og PI3K. Adapterproteiner eller signaliseringsproteiner som Shc, Grb2 eller PI3K rekrutteres til de fosforylerte reseptorene. Fosforylering av adapterproteinene resulterer i aktivering av MAPK- og Akt-signalveiene. MAPK-signalveiaktivering kan evalueres ved bestemmelse av fosforyleringsstatus for Erk og Rsk, mens PI3K-signalveiaktivering kan evalueres ved bestemmelse av fosforyleringsstatus for Akt og p70S6K.

Adresserbare angiogenesebrikker, slik som dem vist på figur 6 og 7, gir således ikke bare mulighet til å bestemme ekspresjonen av alle signaltransduksjonskomponentene som er involvert i angiogenese i en pasientprøve, men også deres aktiveringsstatus. Både MAPK- og PI3K/Akt-signalveiaktivering kan også studeres på den adresserbare brikken. Brikken har internkontroller for å bestemme tumorens eller den tumorassosierte cellens (CEC-er, CEP-er, pericytter osv.) innhold og ikke-spesifikt IgG for å bestemme en hvilken som helst ikke-spesifikk binding.

Figur 8 og 9 viser kombinerte adresserbare arrayer som kan anvendes i oppfinnelsen for å bestemme ekspresjonen og/eller aktiveringsstatus for ErbB-familien av reseptortyrosinkinaser og signaltransduksjonskomponentene som er involvert i angiogenese. Ekspresjonen og/eller aktiveringsstatus for nukleære hormonreseptorer slik som ER (østrogenreseptor) og PR (progesteronreseptor) og andre proteiner slik som NCOR (nukleær reseptorkorepressor), AIB1 (amplifisert i brystkreft-1), IGF-IR, cMET, Ki67 og TOPO II kan dessuten studeres på disse kombinerte adresserbare brikkene. Et annet trekk ved disse brikkene er forekomst av internkontroller for å bestemme tumorens eller den tumorassosierte cellens (CEC-er, CEP-er, pericytter osv.) innhold og ikke-spesifikt IgG for å bestemme en hvilken som helst ikke-spesifikk binding.

Eksempel 8. Valg av pasienter for behandling av brystkreft.

En stor utfordring ved kreftbehandling er valg av terapeutiske regimer som maksimerer virkning og begrenser toksisitet for en bestemt pasient. En relatert utfordring ligger i forsøket på å tilveiebringe nøyaktig diagnostisk, prognostisk og prediktiv informasjon.

Tumorer klassifiseres i dag generelt i henhold til TNM-systemet. Dette systemet anvender tumorens størrelse, forekomst eller fravær av tumor i regionale lymfeknuter og forekomst eller fravær av fjerntliggende metastaser til å tilordne et stadium til tumoren ifølge retningslinjene publisert i AJCC Cancer Staging Manual (Lippincott, 5th ed., s.171–180 (1997)). Det tilordnede stadiet anvendes som grunnlag for valg av egnet behandling og for prognostiske formål. I tillegg til TNM-parameterne anvendes morfologisk utseende for ytterligere å klassifisere tumorer i tumortyper og derved bidra til valg av egnet behandling. Denne

metoden har imidlertid alvorlige begrensninger. Tumorer med lignende histopatologisk utseende kan for eksempel vise vesentlig variabilitet med hensyn til klinisk forløp og respons på behandling. Noen tumorer er dessuten hurtigprogressive, mens andre ikke er det. Noen tumorer responderer videre lett på hormonbehandling eller kjemoterapi, mens andre er resistente.

Assayer for celleoverflatemarkører, f.eks. ved hjelp av immunhistokjemi, har tilveiebrakt midler for kategorisering av visse tumortyper i underklasser. Én faktor som vurderes ved prognose- og behandlingsbeslutninger for brystkreft, er for eksempel forekomst eller fravær av østrogenreseptoren (ER) i tumorprøver. ER-positive brystkrefttyper responderer typisk mye lettere på hormonbehandlinger slik som tamoksifen, som opptrer som et østrogendempende middel i brystvev, enn ER-negative tumorer. Selv om disse analysene er nyttige, predikerer de bare delvis brysttumorenes kliniske atferd. Kreft er omfattet av fenotypisk diversitet som gjeldende diagnostiske hjelpemidler ikke klarer å detektere. Det er derfor fortsatt stor uenighet om hvordan pasienter bør stratifiseres blant potensielle behandlinger for å optimalisere resultatet (for brystkreft: se for eksempel "NIH Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, Nov. 1-3, 2000", J. Nat. Cancer Inst. Monographs, 30:5–15 (2001) og Di Leo et al., Int. J. Clin. Oncol., 7:245–253 (2002)).

Den foreliggende oppfinnelsen omfatter erkjennelsen av at signalveier kan anvendes til å gi ny innsikt i den biologiske etiologien for kreft og sykdomsprogresjon. Dette gir mulighet for behandling av krefttyper med forskjellige aktiverte signalveier ved hjelp av et personlig tilpasset terapeutisk regime.

Det anvendes i dag tre forskjellige molekylære markører til å definere fire forskjellige underklasser av brystkreft med store terapeutiske ringvirkninger. De tre markørene er ER, PR og HER-2/ErbB2. De fire store underklassene er som følger:

1. ER+/PR+/ErbB2-
2. ER+/ErbB2+
3. ER-/ErbB2+
4. ER-/PR-/ErbB2-

Én aktuell teori deler brystkreft inn i fem molekylære undertyper: luminal A, luminal B, basallignende, HER-2/neu-positiv og normal brystlignende (se for eksempel Carey et al., JAMA, 295:2492–2502 (2006), Fan et al., N. Engl. J. Med., 355:560–569 (2006), Hannemann et al., British J Cancer, 95:1334–1341 (2006), Poternski et al., Oncology, 69:478–485 (2005)). Mye av det som i dag er kjent om disse undertypene, er direkte knyttet til de karakteristikker som allerede forstås tilfredsstillende, slik som hormonreseptor- og HER-2/neu-status.

Østrogen spiller en viktig rolle i brystkreftpatogenese, og selektiv interferens av den østrogen-/ER-medierte signaleringskaskaden er det mest virkningsfulle middelet for behandling av ER-positive brystkreftpasienter. ER regulerer vekst og differensiering i både normale og ondartede brystceller. Ekspresjon av funksjonell ER og/eller PR er avgjørende for at en tumor skal være responsiv på hormondempende behandlinger ("hormonresponsiv"), og flere studier har demonstrert at ekspresjon av ER er svært prediktivt for respons på hormondempende behandlinger, selv om ekspresjonen bare er svakt prognostisk. ER virker ikke alene for å stimulere tumorvekst. I stedet virker et komplekst interaksjonsnett for å sikre kreftcellenes levedyktighet. Forståelse av dette nettet gir en vitenskapelig begrunnelse for valg av målrettede behandlinger.

Eksemplene på pasientprofiler som er vist nedenfor i tabell 4–22, illustrerer hvordan en analyse av signalveiene som er aktive i sirkulerende tumorceller (CTC-er) fra blod- eller kreftceller oppnådd fra en nålbiopsi, kan anvendes til å hjelpe leger med å bestemme seg for et virkningsfullt behandlingsløp for en brysttumor, f.eks. neoadjuvant behandling før kirurgi for å redusere brysttumorens størrelse eller behandling av pasienter med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft. Aktiveringsnivåene for forskjellige komponenter i ErbB og nukleære hormonreseptorsignalveier i CTC-er eller biopsiavledede kreftceller kan kort fortalt bestemmes under nærvær eller fravær av forskjellige kombinasjoner av terapeutiske testmidler.

Tabell 4

Pasient 4001: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Høy
Progesteronreseptor	Høy		Middels
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Svak	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
PTEN	Middels	Middels	Middels
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Middels		Svak
TOPO II	Middels		Middels

Det ble tatt biopsi av pasienten (premenopausal kvinne og lymfeknutenegativ), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR. Pasienten ble behandlet med tamoksifen. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på tamoksifen. ER antas å rekruttere korepressorproteinet NCOR under nærvær av antagonister slik som tamoksifen, og denne rekrutteringen antas å være avgjørende for full antagonistaktivitet.

Tabell 5

Pasient 4002: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen + kjemoterapi**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Høy
Progesteronreseptor	Lav		Svak
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Svak	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak

Pasient 4002: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen + kjemoterapi**
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO II	Høy		Høy

Det ble tatt biopsi av pasienten (premenopausal kvinne og lymfeknutenegativ), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER og høy Ki67-ekspresjon. Pasienten ble behandlet med tamoksifen + kjemoterapi. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på tamoksifen + kjemoterapi. ER antas å rekruttere korepressorproteinet NCOR under nærvær av antagonister slik som tamoksifen, og denne rekrutteringen antas å være avgjørende for full antagonistaktivitet.

Tabell 6

Pasient 4003: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen + kjemoterapi**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Høy
Progesteronreseptor	Høy		Svak

Pasient 4003: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen + kjemoterapi**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Svak	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO II	Høy		Høy

Det ble tatt biopsi av pasienten (premenopausal kvinne og lymfeknutepositiv), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR. Pasienten ble behandlet med tamoksifen + kjemoterapi. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på tamoksifen + kjemoterapi. ER antas å rekruttere korepressorproteinet NCOR under nærvær av antagonister slik som tamoksifen, og denne rekrutteringen antas å være avgjørende for full antagonistaktivitet.

Tabell 7

Pasient 4004: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor**
ER	Høy		Middels
ER (Ser118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AlB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Høy		Middels
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Middels		Svak
TOPO II	Lav		

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR sammen med noe aktivering av ErbB 1 via MISS (ER-aktivering i cytoplasma med resulterende krysstaleaktivering av ErbB1). Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor for å stoppe all ER-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitorer.

Tabell 8

Pasient 4005: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor + kjemoterapi**
ER	Høy	Middels	
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Høy		Middels
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak

Pasient 4005: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor + kjemoterapi**
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO II	Høy		

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR sammen med noe aktivering av ErbB1 via MISS (ER-aktivering i cytoplasma med resulterende krysstaleaktivering av ErbB1). Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + kjemoterapi for å stoppe all ER-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitor + kjemoterapi.

Tabell 9

Pasient 4006: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor eller tamoksifen + kjemoterapi**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav

Pasient 4006: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor eller tamoksifen + kjemoterapi**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER (PR-negative tumorer) sammen med noe aktivering av ErbB1 via MISS (ER-aktivering i cytoplasma med resulterende krysstaleaktivering av ErbB1). Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + kjemoterapi for å stoppe all ER-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitor + kjemoterapi.

Tabell 10 tilveiebringer et eksempel på en pasient med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft som har tilbakefall ved endokrin behandling og/eller kjemoterapi. Det hadde gått minst 3 uker siden pasienten mottok adjuvant kjemoterapi og hormonal behandling for den lokalt tilbakevendende eller metastatiske brystkreften.

Tabell 10

Pasient 4007: (ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med tamoksifen eller aromataseinhibitor + taksan + Avastin®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Høy		Middels
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Endotelceller:

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR sammen med noe aktivering av ErbB1 via MISS (ER-aktivering i cytoplasma med resulterende krysstaleaktivering av ErbB1) og VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + kjemoterapi + Avastin® for å stoppe all ER- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en aromataseinhibitor + kjemoterapi + Avastin®.

Tabell 11

Pasient 4008: (Høy AIB1; ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med fulvestrant**
ER	Høy		Lav
ER (Ser118)		Høy	Svak

Pasient 4008: (Høy AIB1; ER+/PR+/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med fulvestrant**
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		S. høy	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Svak
Progesteronreseptor	Høy		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Svak	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER/PR sammen med svært høy ekspresjon av ER:AIB1-komplekset. Pasienten ble behandlet med fulvestrant (Faslodex®) for å bryte ned ER. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på fulvestrant.

Tabell 12

Pasient 4009: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med aromataseinhibitor + kjemoterapi**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Svak	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. Pasienten ble behandlet

med en aromataseinhibitor + kjemoterapi for å stoppe all ER-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitor + kjemoterapi.

Tabell 13

Pasient 4010: (ER+/PR-/ErbB1+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib eller Erbitux®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1 R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Svak	Svak
P70S6K		Svak	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. ErbB 1 ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib eller Erbitux® for å stoppe all ER/ErbB1-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en aromataseinhibitor + lapatinib eller Erbitux®.

Tabell 14

Pasient 4011: (ER+/PR-/ErbB1+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib eller Erbitux®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-			
kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-			
kompleks		Svak	Middels
Progesteron -			
reseptor	Lav		Lav
IGF-1 R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Høy	Høy	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak

Pasient 4011: (ER+/PR-/ErbB1+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib eller Erbitux®**
Shc		Høy	Svak
PI3K		Svak	Svak
Erk		Høy	Svak
Rsk		Høy	Svak
Akt		Svak	Svak
P70S6K		Svak	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. ErbB 1 ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib eller Erbitux® for å stoppe all ER/ErbB1-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en aromataseinhibitor + lapatinib eller Erbitux®.

Tabell 15

Pasient 4012: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-		Svak	Middels

Pasient 4012: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib**
kompleks			
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Middels	Middels	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. ErbB 1 og ErbB2 ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor og lapatinib for å stoppe all ER/ErbB1/ErbB2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitor + lapatinib.

Tabell 16

Pasient 4013: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Middels	Middels	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. ErbB1, ErbB2 og ErbB3 ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib for å stoppe all

ER/ErbB1/ErbB2/ErbB3-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på behandling med en aromataseinhibitor + lapatinib.

Tabell 17 tilveiebringer et eksempel på en pasient med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft som har tilbakefall ved antiangiogen behandling. Det hadde gått minst 3 uker siden pasienten mottok adjuvant kjemoterapi og hormonal behandling for den lokalt tilbakevendende eller metastatiske brystkreften.

Tabell 17

Pasient 4014: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Middels	Middels	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak

Pasient 4014: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin®**
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Endotelceller:

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-	Null	Middels	Svak
kompleks			
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene og endotelcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER sammen med VEGFR2-aktivering. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. ErbB1, ErbB2 og ErbB3 ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin® for å stoppe all ER- + ErbB1-, ErbB2-, ErbB3- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny

biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin®.

Tabell 18

Pasient 4015: (ER+/PR-/ErbB2-/IGF-1R+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + anti-IGF-1R-antistoff**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Høy/middels	Høy	Svak
ErbB1	Lav	Lav	Svak
ErbB2	Lav	Lav	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne), eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER. PR var uttrykt ved svært lave nivåer. IGF-1R ble aktivert. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + anti-IGF-1R-antistoffer for å stoppe all ER/IGF-1R-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på aromataseinhibitor + anti-IGF-1R-antistoffer.

Tabell 19

Pasient 4016: (ER+/PR+/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + Herceptine® + Avastin®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Høy		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Svak	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Lav	Lav
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak

Pasient 4016: (ER+/PR+/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + Herceptine® + Avastin®**
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Endotelceller:

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene og endotelcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER, PR og ErbB2 sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + Herceptin® + Avastin® for å stoppe all ER-, ErbB2- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil

responderer således på kombinasjonsbehandling med en aromataseinhibitor + Herceptin® + Avastin®.

Tabell 20

Pasient 4017: (ER+/PR+/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Høy		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Middels	Høy	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Høy	Svak
Erk		Høy	Svak
Rsk		Høy	Svak
Akt		Høy	Svak
P70S6K		Høy	Svak
Ki67	Høy		Svak

Endotelceller:			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene og endotelcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER, ErbB2 og p95ErbB2 sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin® for å stoppe all ER-, ErbB1-, ErbB2-, ErbB3-, p95ErbB2- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonsbehandling med en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin®.

Tabell 21

Pasient 4018: (ER+/PR-/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + Herceptin® + taksaner + Avastin®**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Svak	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Lav	Lav
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak

Endotelceller:

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene og endotelcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER og ErbB2 sammen med VEGFR2-aktivering. PR-nivåene var lave. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + Herceptin® + taksaner + Avastin® for å stoppe all ER-, ErbB2- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en aromataseinhibitor + Herceptin® + Avastin® + kjemoterapi.

Tabell 22

Pasient 4019: (ER+/PR-/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin® + kjemoterapi**
ER	Høy		Middels
ER (Ser 118)		Høy	Svak

Pasient 4019: (ER+/PR-/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin® + kjemoterapi**
ER (Ser 167)		Høy	Svak
ER:AIB1-kompleks		Middels	Svak
ER:N-CoR-kompleks		Svak	Middels
Progesteronreseptor	Lav		Lav
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Middels	Høy	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Høy	Svak
Erk		Høy	Svak
Rsk		Høy	Svak
Akt		Høy	Svak
P70S6K		Høy	Svak
Ki67	Høy		Svak
Endotelceller:			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak

Pasient 4019: (ER+/PR-/ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med AI + lapatinib + Avastin® + kjemoterapi**
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av tumorcellene og endotelcellene viste høy ekspresjon og aktivering av ER, ErbB2 og p95ErbB2 sammen med VEGFR2-aktivering. PR-nivået var lavt. Pasienten ble behandlet med en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin® + kjemoterapi for å stoppe all ER-, ErbB1-, ErbB2-, ErbB3-, p95ErbB2- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonsbehandling med en aromataseinhibitor + lapatinib + Avastin® + kjemoterapi.

I visse aspekter gir følgelig den foreliggende oppfinnelsen mulighet for intelligent valg av aktiveringsmarkører som best vil predikere overlevelse. De mest egnede aktiveringsmarkørene kan variere mellom forskjellige legemidler, og kan anvendes som en veiledning for å velge mellom monoterapi med anticancer-legemiddel og kombinasjonsbehandling med en blanding av anticancer-legemidler for å tilveiebringe personlige, målrettede behandlinger.

Eksempel 9. Valg av pasienter for behandling av Her2-positiv brystkreft.

I USA er det cirka 200 000 tilfeller av brystkreft hver år. HER-2/ErbB2, en 185 kDa membranreseptortyrosinkinase, er detektert ved 18 % til 20 % av brystkreftene og har vært assosiert med en økt rate av tilbakefall og dødsfall. ErbB2 er nå en etablert fordelaktig prediktiv markør fra behandlinger slik som trastuzumab (Herceptin®).

Det siste tiåret ble det gjort stort fremskritt i behandlingen av ErbB2+-brystkreft. Herceptin® har endret sykdommens naturlige historikk i de metastatiske og adjuvante scenariene. Lapatinib, som nå er kommersielt tilgjengelig som Tykerb® (GlaxoSmithKline), er et viktig tilsetningsstoff og det første av det som sannsynligvis vil bli mange midler som vil bli tilgjengelige i scenariet etter Herceptin®.

Resistens overfor Herceptin® utvikler seg dessverre i mange tilfeller, og i nesten alle tilfeller i det metastatiske scenariet. Både *de novo*-resistens og ervervet resistens overfor Herceptin® er også observert.

Mulige resistensmåter overfor Herceptin® er:

- endret måleksprеsjon (endring i ErbB2-status)
- signalisering ved forskjellige signalveier (IGF-1R)
- foretrukket dimerisering med andre reseptorer (ErbB 1 eller ErbB3)
- suboptimal legemiddeltilførsel (metastatisk CNS-sykdom hos kvinner med ErbB2-brystkreft later til å være særlig vanlig. Insidensen av metastatisk CNS-sykdom hos pasienter med metastatisk ErbB2+-brystkreft kan være så høy som én tredjedel av pasientene med metastatisk ErbB2+-sykdom).
- PTEN-endring
- PI3K-mutasjoner
- P95ErbB2-ekspresjon eller ErbB2-trunkering
- overekspresjon eller amplifikasjon av cMET

Markører for valg/effekt av behandling:

- 5-FU/kapcitibin: ekspresjon av tymidylatsyntetase (TS)
- ekspresjon av dihydropyrimidindehydrogenase (DPD)
- reduksjon av HDAC-er ved TS-ekspresjon

- taksaner: ErbB2
- antrasykliner: TOPO2-overekspresjon
- ErbB2-positiv: (5-FU eller taksaner eller antrasykliner)

Flere kjemoterapiregimer er testet i kombinasjon med Herceptin®. Den foretrukne kombinasjonen er behandling med paklitaxel, docetaxel, et taksan pluss et platinasalt i det metastatiske scenariet. Alle de målrettede behandlingene kan også anvendes i kombinasjon.

Pasientprofileksemplene vist nedenfor i tabell 23–25 illustrerer hvordan en analyse av signalveiene som er aktive i sirkulerende tumorceller (CTC-er) fra blod eller kreftceller oppnådd fra en biopsi, kan anvendes til å hjelpe leger med å velge pasienter som kan være responsive overfor trastuzumab (Herceptin®) og derfor dra fordel av slik behandling for behandling av en brysttumor. Pasientprofileksemplene vist nedenfor i tabell 26–31 illustrerer hvordan en analyse av signalveiene som er aktiv i CTC-er fra blod eller kreftceller oppnådd fra en biopsi, kan anvendes til å hjelpe leger med å velge en egnet behandling for pasienter etter Herceptin®-tilbakefall som enten skyldes *de novo*-resistens eller ervervet resistens. Aktiveringsnivåene for forskjellige komponenter av signaltransduksjonsveiene, slik som ErbB-reseptorveiene i CTC-er eller biopsiavledede kreftceller kan kort fortalt bestemmes under nærvær eller fravær av forskjellige kombinasjoner av terapeutiske testmidler.

Tabell 23

Pasient 5001: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + Avastin® + taksaner (valgfritt)**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Svak	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak

Pasient 5001: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + Avastin® + taksaner (valgfritt)**
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak
Endotelceller:			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Middels	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB2 sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Herceptin® + taksan + Avastin® for å stoppe all ErbB2- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på Herceptin® + Avastin® + kjemoterapi.

Tabell 24

Pasient 5002: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + Avastin® + FEC: [fluoruracil, epirubicin (antrasyklin) og syklofosfamid]**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Svak	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Høy		Høy
Endotelceller:			

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak
Shc		Sterk	Svak
PI3K		Sterk	Svak
Erk		Sterk	Svak
Rsk		Sterk	Svak
Akt		Sterk	Svak
P70S6K		Sterk	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB2 og TOPO2 sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Herceptin® + antrasyklin + kjemoterapi + Avastin® for å stoppe all ErbB2-, VEGFR2- og TOPO2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonsbehandling med Herceptin® + antrasyklin + kjemoterapi + Avastin®.

Tabell 25

Pasient 5003: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171 + taksaner (valgfritt)**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Svak	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels

Pasient 5003: (ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171 + taksaner (valgfritt)**	
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Herceptin® + sorafinib + Avastin® for å stoppe all ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på Herceptin® + sorafinib + kjemoterapi.

Tabell 26

Pasient 5004: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Høy	Høy	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Middels	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-	Null	Middels	Svak	Svak

Pasient 5004: (ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**	
kadherin-R2-kompleks				
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB1, ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med lapatinib + sorafinib for å stoppe all ErbB1-, ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden ErbB1 og PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Herceptin®- og Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Lapatinib ble anvendt i stedet for Herceptin® siden lapatinib inhiberer både ErbB1 og ErbB2. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på lapatinib + sorafinib + kjemoterapi.

Tabell 27

Pasient 5005: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171 + anti-IGF-1 R-antistoff**
IGF-1 R	Høy	Høy	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels

Pasient 5005: (ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171 + anti-IGF-1 R-antistoff**	
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av IGF-1R, ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Herceptin® + sorafinib + Avastin® + IGF-1R-antistoff for å stoppe all IGF-1R-, ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden IGF-1R og PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Herceptin®-og Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. IGF-1R-antistoff sammen med Herceptin® ble anvendt i stedet for Herceptin® alene for å inhibere både IGF-1R og ErbB2. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor.

En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på Herceptin® + IGF-1R-antistoff + sorafinib + kjemoterapi.

Tabell 28

Pasient 5006: (ErbB2+/PTEN-delesjon)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/- GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171 + rapamycin**	
IGF-1R	Lav	Lav	Svak	
ErbB1	Middels	Middels	Middels	
ErbB2	Høy	Høy	Svak	
P95 ErbB2	Middels	Høy	Svak	
ErbB3	Lav	Middels	Middels	
ErbB4	Lav	Svak	Svak	
PTEN	Lav	Lav	Lav	
Shc		Middels	Svak	
PI3K		Middels	Middels	
Erk		Middels	Svak	
Rsk		Middels	Svak	
Akt		Middels	Høy	
P70S6K		Middels	Svak	
Ki67	Høy		Svak	
TOPO2	Lav		Svak	
Endotelceller og pericytter:				

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av p95 ErbB2, ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten har også en PTEN-delesjon. Pasienten ble behandlet med lapatinib + sorafinib for å stoppe all ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden p95 ErbB2 og PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Herceptin®- og Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Lapatinib ble anvendt i stedet for Herceptin® for å inhibere både p95 ErbB2 og ErbB2, og mTor-inhibitor ble anvendt for å stoppe nedstrøms signalaktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi

proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på lapatinib + sorafinib + rapamycin + kjemoterapi.

Tabell 29

Pasient 5007: (ErbB2+/p95 ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-IGF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**	
IGF-1R	Lav	Lav	Svak	
ErbB1	Middels	Middels	Svak	
ErbB2	Høy	Høy	Svak	
P95 ErbB2	Høy	Høy	Svak	
ErbB3	Lav	Middels	Svak	
ErbB4	Lav	Svak	Svak	
Shc		Middels	Svak	
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**	
PI3K		Middels	Svak	
Erk		Middels	Svak	
Rsk		Middels	Svak	
Akt		Høy	Svak	
P70S6K		Middels	Svak	
Ki67	Høy		Svak	
TOPO2	Lav		Svak	
Endotelceller og pericytter:				

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av p95 ErbB2, ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med lapatinib + sorafinib for å stoppe all ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden p95 ErbB2 og PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Herceptin®- og Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Lapatinib ble anvendt i stedet for Herceptin® for å inhibere både p95 ErbB2 og ErbB2. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av lapatinib + sorafinib + kjemoterapi.

Tabell 30

Pasient 5008: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**
IGF-1R	Lav	Lav	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Middels
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-	Null	Middels	Svak	Svak

Pasient 5008: (ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med lapatinib + taksaner + sorafinib eller sunitinib eller AZD2171**	
kadherin-R2-kompleks				
PDGFRa	Middels	Høy	Svak	Høy
PDGFRb	Middels	Høy	Svak	Høy
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB2 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten hadde hjernemetastaser. Pasienten ble behandlet med lapatinib + sorafinib for å stoppe all ErbB2-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Lapatinib ble anvendt i stedet for Herceptin® siden pasienten hadde hjernemetastaser. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på lapatinib + sorafinib + kjemoterapi.

Tabell 31

Pasient 5009: (ErbB2+)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + taksaner + Avastin® + lapatinib**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Høy	Høy	Svak
P95 ErbB2	Middels	Middels	Svak
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-	Null	Middels	Svak	Svak

Pasient 5009: (ErbB2+)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Herceptin® + taksaner + Avastin® + lapatinib**	
R2-kompleks				
PDGFRa	Middels	Lav	Svak	Svak
PDGFRb	Middels	Lav	Svak	Svak
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste høy ekspresjon og aktivering av ErbB1, ErbB2, ErbB3 og PDGFR sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Herceptin® + lapatinib + sorafinib for å stoppe all ErbB1-, ErbB2-, ErbB3-, PDGFR- og VEGFR2-relatert aktivitet. Siden ErbB 1 og PDGFR er overuttrykt og aktivert hos Herceptin®- og Avastin®-resistente pasienter, indikerer informasjon slik som den presentert ovenfor at AZD2171 eller sorafinib, som inhiberer PDGFR og VEGFR, kan være foretrukne midler for å behandle slike tumorer. Lapatinib ble anvendt med Herceptin® for å inhibere både ErbB1, ErbB2, og ErbB3. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av lapatinib + Herceptin® + sorafinib + kjemoterapi.

Eksempel 10. Valg av pasienter for behandling av ER-, PR- og ErbB2-negativ brystkreft.

Cirka 15–20 % av kvinner med brystkreft har den triple negative krefttypen. Pasienter med "trippel reseptornegativ brystkreft" har et fullstendig fravær av hormonreseptorene ER, PR og HER-2/ErbB2, med et aggressivt klinisk forløp og en knapphet på behandlingsalternativer. Det eneste terapeutiske alternativet er kjemoterapi, og i denne forbindelse er valget av cytostatiske midler begrenset. Standardbehandlingen for trippel negativ brystkreft er typisk en kombinasjon av kjemoterapi, kirurgi og/eller strålingsbehandling. Når kvinner med trippel negativ brystkreft behandles med standardbehandling, har de et verre langsiktig resultat enn kvinner med ikke-trippel negativ brystkreft. Cellene ved triple negative brystkrefttyper har vanligvis ErbB1 uttrykt på sin celleoverflate. Kvinner med ErbB1-positiv brystkreft har verre langsiktig resultat enn kvinner hvis tumorer ikke uttrykker ErbB1. Det er således et behov i teknikken for fremgangsmåter for profilering, valg og prediksjon av behandlingsalternativer for pasienter med trippel negativ brystkreft.

Tabell 32

Pasient 6001: (Trippel negativ med lav ErbB1)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med taksaner + Avastin®**
ER	Lav		
PR	Lav		
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Lav	Svak	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak

Pasient 6001: (Trippel negativ med lav ErbB1)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med taksaner + Avastin®**
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak

Pasient 6001: (Trippel negativ med lav ErbB1)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med taksaner + Avastin®**	
PDGFRa	Middels	Lav	Svak	Svak
PDGFRb	Middels	Lav	Svak	Svak
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinner) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste lav ekspresjon og ingen aktivering av ER, ErbB2 og p95 ErbB2, med bare VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med taksaner + Avastin® for å stoppe VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på Avastin® + kjemoterapi.

Tabell 33

Pasient 6002: (Trippel negativ)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Tarceva® + taksaner + Avastin®**
ER	Lav		
PR	Lav		

Pasient 6002: (Trippel negativ)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Tarceva® + taksaner + Avastin®**
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Svak	Svak
P95 ErbB2	Lav	Svak	Svak
ErbB3	Lav	Svak	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak
Endotelceller og pericytter:			

Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Lav	Svak	Svak
PDGFRb	Middels	Lav	Svak	Svak
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste middels ekspresjon og aktivering av ErbB1 og VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med Tarceva® + Avastin® for å stoppe all ErbB 1- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på Tarceva® + Avastin® + kjemoterapi.

Tabell 34

Pasient 6003: (Trippel negativ)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Pan Her-inhibitor + taksaner + Avastin®**
PTEN	Middels		
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Lav	Svak	Svak
PDGFRb	Middels	Lav	Svak	Svak
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste middels ekspresjon og aktivering av ErbB1, ErbB2 og ErbB3 sammen med VEGFR2-aktivering. Pasienten ble behandlet med en Pan Her-inhibitor + Avastin® for å stoppe all ErbB1-, ErbB2-, ErbB3- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på kombinasjonen av en Pan Her-inhibitor + Avastin® + kjemoterapi. Eksempler på Pan Her-inhibitorer inkluderer blant annet BMS-599626 og CI-1033.

Tabell 35

Pasient 6004: (Trippel negativ)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Pan Her-inhibitor + taksaner + Avastin® + rapamycin**
ER	Lav		
PR	Lav		
IGF-1R	Lav	Svak	Svak
ErbB1	Middels	Middels	Svak
ErbB2	Lav	Middels	Svak
P95 ErbB2	Null	Null	Null

Pasient 6004: (Trippel negativ)			
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Pan Her-inhibitor + taksaner + Avastin® + rapamycin**
ErbB3	Lav	Middels	Svak
ErbB4	Lav	Svak	Svak
PTEN	Null		
Shc		Middels	Svak
PI3K		Middels	Svak
Erk		Middels	Svak
Rsk		Middels	Svak
Akt		Middels	Svak
P70S6K		Middels	Svak
Ki67	Høy		Svak
TOPO2	Lav		Svak

Endotelceller og pericytter:				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (fosforyleringsnivå)**	**Aktivering med AZD2171 eller sorafinib eller sunitinib**	**Aktivering med Avastin®**
VEGFR2	Middels	Sterk	Svak	Svak
VEGFR1	Middels	Sterk	Svak	Svak
Tie 2	Lav	Svak	Svak	Svak
V-kadherin-R2-kompleks	Null	Middels	Svak	Svak
PDGFRa	Middels	Lav	Svak	Svak

Pasient 6004: (Trippel negativ)				
Reseptor	**Ekspresjon**	**Aktivering (+/-GF) (fosforyleringsnivå)**	**Behandling med Pan Her-inhibitor + taksaner + Avastin® + rapamycin**	
PDGFRb	Middels	Lav	Svak	Svak
Shc		Sterk	Svak	Svak
PI3K		Sterk	Svak	Svak
Erk		Sterk	Svak	Svak
Rsk		Sterk	Svak	Svak
Akt		Sterk	Svak	Svak
P70S6K		Sterk	Svak	Svak

Det ble tatt biopsi av pasienten (pre- eller postmenopausal kvinne) med lokalt tilbakevendende eller metastatisk brystkreft, eller CTC-er ble isolert fra blod. Analyse av hennes tumorceller og endotelceller viste middels ekspresjon og aktivering av ErbB1, ErbB2 og ErbB3 sammen med VEGFR2-aktivering. PTEN ble slettet. Pasienten ble behandlet med en Pan Her-inhibitor + Avastin® + mTOR-inhibitor for å stoppe all ErbB1-, ErbB2-, ErbB3- og VEGFR2-relatert aktivitet. Pasienten responderte og hadde ved ny biopsi proteinprofilen som vist ovenfor. En pasient med ovenstående proteinprofil responderer således på en Pan Her-inhibitor + Avastin® + rapamycin + kjemoterapi.

Eksempel 11. Overvåkning av brystkreftpasienter for EGFR- og/eller HER-2-aktivering styrer behandlingsvalg.

Fem brystkreftpasienter under behandling ble undersøkt for antall av sirkulerende tumorceller (CTC), EGFR-ekspresjon på CTC-er ved farging og EGFR- og HER-2 (ErbB2)-fosforylering ved hjelp av proksimitetsassayene beskrevet heri. Pasientdemografi, krefthistorikk og nåværende legemidler er vist i henholdsvis tabell 36, 37 og 38. Resultatene av tester på primærtumoren for østrogenreseptor (ER), progesteronreseptor (PR) og HER-2 er gitt i tabell 39. Tabell 40 og 41 viser antallet av CTC-er detektert i hver prøve og de relative fosforyleringsnivåene for EGFR og HER-2. Relative fosforyleringsnivåer ble

beregnet ved hjelp av gjennomsnittet av 4 bufferkontroller. Fosforyleringsinformasjonen er også plottet på figur 10 og 11. Figur 12 viser bilder av CTC-farging for EGFR, cytokeratin (CK) og cytokeratin med DAPI. Cellelinjekontrollene var henholdsvis SKBr3 og A431, som er positiv for HER-2- og EGFR-ekspresjon. Fullblod fra 6 normale personer ble behandlet ved hjelp av samme protokoll som kontroller. Ingen av normalprøvene viste EGFR- eller HER-2-fosforylering over bakgrunn.

Tabell 36

Demografi for de 5 brystkreftpasientene i studien.			
Pasientnummer	**Fødselsdato**	**Kjønn**	**Rase/etnisitet**
01-003	01. APR. 1951	Kvinne	Latinamerikansk
01-006	15. OKT. 1929	Kvinne	Asiatisk
01-014	29. SEP. 1966	Kvinne	Latinamerikansk
01-019	08. JUN. 1954	Kvinne	Asiatisk
02-017	03. OKT. 1954	Kvinne	Hvit

Tabell 37

Krefthistorikk for de 5 brystkreftpasientene i studien.					
Pasientnummer	**Krefttype**	**Stadium**	**Metastasested**	**Kontroll hvis den pågår**	**Behandlingstype**
01-003	BRYST	3C	LYMFEKNUTER VENSTRE BRYSTVEGG	Kontrollert	KJEMOTERAPI
01-006	BRYST	4	LYMFEKNUTER OG LEVER	Kontrollert	KJEMOTERAPI
01-014	BRYST	4	LYMFEKNUTER	Kontrollert	KJEMOTERAPI
01-019	BRYST	4	BEN LEVER	Kontrollert	KJEMOTERAPI
02-017	BRYST	3	LYMFEKNUTER	Ikke kontrollert	STRÅLING/KJEMOTERAPI

Tabell 38

Nåværende legemidler for de 5 brystkreftpasientene i studien.			
Pasientnummer	**Legemiddelnavn**	**Diagnose assosiert med behandlingen**	**Dose**
01-003	BENADRYL	LEGEMIDDEL FØR KJEMO	25 MG Q 28 DAGER
01-003	DEKADRON	LEGEMIDDEL FØR KJEMO	20 MG Q 28 DAGER
01-003	HERCEPTIN	KJEMO FOR BRYSTKREFT	8 MG Q 28 DAGER
01-003	TAGAMET	FØR KJEMO FOR BRYSTKREFT	300 MG Q 28 DAGER
01-003	TAXOTERE	KJEMO FOR BRYSTKREFT	40 MG Q 28 DAGER
01-003	TYLENOL	SMERTE	1 G Q 28 DAGER
01-003	ZOFRAN	FØR KJEMO FOR BRYSTKREFT	32 MG Q 28 DAGER
01-006	DEKADRON	PREMED FOR KJEMO	20 MG Q 2 UKER
01-006	GEMZAR	KJEMO FOR BRYSTKREFT	1000 MG Q 2 UKE
01-006	HERCEPTIN	KJEMO FOR BRYSTKREFT	100 MG Q UKER
01-006	KYTRIL	PREMED FOR KJEMO	1 MG Q 2 UKER
01-006	TYLENOL	PREMED	1 G Q 2 UKER
01-014	KARBOPLATIN	KJEMO FOR BRYSTKREFT	650 MG Q 21 DAGER
01-014	DEKADRON	PREMED FOR KJEMO	20 MG Q 21 DAGER
01-014	HERCEPTIN	KJEMO FOR BRYSTKREFT	270 MG Q 21

Nåværende legemidler for de 5 brystkreftpasientene i studien.			
Pasientnummer	**Legemiddelnavn**	**Diagnose assosiert med behandlingen**	**Dose**
			DAGER
01-014	ROCEPHIN	ANTIBIOTIKA FOR FEBER	1000 MG PRN
01-014	TAXOTERE	KJEMO FOR BRYSTKREFT	100 MG Q 21 DAGER
01-014	ZOFRAN	PREMED FOR KJEMO	32 MG Q 21 DAGER
01-019	AREDIA	KJEMO FOR BRYSTKREFT	90 MG Q 21 DAGER
01-019	BENADRYL	PREMED FOR KJEMO	25 MG Q 21 DAGER
01-019	KARBOPLATIN	KJEMO FOR BRYSTKREFT	580 MG Q 21 DAGER
01-019	DEKADRON	PREMED FOR KJEMO	20 MG Q 21 DAGER
01-019	KYTRIL	PREMED FOR KJEMO	1 MG Q 21 DAGER
01-019	MORFINSULFAT	FØR KJEMO	2 MG PRN
01-019	TAGAMET	PREMED FOR KJEMO	300 MG Q 21 DAGER
01-019	TAXOTERE	KJEMO FOR BRYSTKREFT	110 MG Q 21 DAGER
01-019	ZOCOR	HYPERKOLESTEROLEMI	10 MG ÉN QD
02-017	ADRIAMYCIN	BRYSTKREFT	79 MG QD 21 DAGER
02-017	BENADRYL	KLØE	25 MG Q 21 DAGER
02-017	CYTOXEN	BRYSTKREFT	790 MG Q 21

Nåværende legemidler for de 5 brystkreftpasientene i studien.			
Pasientnummer	**Legemiddelnavn**	**Diagnose assosiert med behandlingen**	**Dose**
			DAGER
02-017	DEKADRON	KVALME	20 MG Q 21 DAGER
02-017	VICODIN	KREFTSMERTE	325 MG TID PRN
02-017	ZOFRAN	KVALME OG OPPKAST	32 MG Q 21 DAGER

Tabell 39

Diagnostiske testresultater på ER, PR og HER-2 for de 5 brystkreftpasientene i studien.			
Pasientnummer	**Er pasienten ER-positiv?**	**Er pasienten PR-positiv?**	**Er pasienten HER2-positiv?**
01-003	Nei	Nei	Ja
01-006	Nei	Nei	Ukjent
01-014	Nei	Nei	Ja
01-019	Ja	Nei	Nei
02-017	Nei	Nei	Nei

Tabell 40

Antall CTC-er (per 7,5 ml) og relative EGFR-fosforyleringsnivåer for 5 brystkreft- og 6 normalprøver.						
	Brystkreft			**Normal**		
Serienr.	Pasient-ID	CTC	Relativt	Pasient-ID	CTC	Relativt
			EGFR-nivå			EGFR-nivå
1	01-014	3	0,7	02-007	0	1,14
2	01-003	1	1,26	01-013 0		1,31

Antall CTC-er (per 7,5 ml) og relative EGFR-fosforyleringsnivåer for 5 brystkreft- og 6 normalprøver.						
	Brystkreft			**Normal**		
Serienr.	Pasient-ID	CTC	Relativt	Pasient-ID	CTC	Relativt
			EGFR-nivå			EGFR-nivå
3	01-019	4	0,88	01-011	0	1,2
4	01-006	1	3,27	01-015	1	0,68
5	02-017	3	2,44	02-012	0	1,32
6				02-013	0	0,68

Tabell 41

Antall CTC-er (per 7,5 ml) og relative HER-2-fosforyleringsnivåer for 5 brystkreft- og 6 normalprøver.						
	Brystkreft			**Normal**		
Serienr.	Pasient-ID	CTC	Relativt	Pasient-ID	CTC	Relativt
			HER-2-nivå			HER-2-nivå
1	01-014	3	0,66	02-007	0	1,13
2	01-003	1	1	01-013	0	1,15
3	01-019	4	0,94	01-011	0	1,31
4	01-006	1	2,52	01-015	1	0,76
5	02-017		3 2,14	02-012	0	1,07
6				02-013	0	0,59

Pasient 01-019 testet positivt for ER og negativt for PR- og HER-2-overekspresjon i primærtumoren. Denne pasienten fikk ikke Herceptin® og ble behandlet med Taxotere® + karboplatin på blodtappingstidspunktet. Fire CTC-er ble identifisert. Ingen av disse cellene farget positivt for EGFR-ekspresjon med Veridex CellSearch™-systemet. Etter stimulering av de isolerte CTC-ene med ligand var det ingen detekterbar fosforylering av verken EGFR eller HER-2 i proksimitetsassayene. Disse dataene informerer legen om at pasientens

tumorceller ikke fortsetter å være drevet av EGFR/HER-2-signalveier, så det er ingen grunn til å endre den nåværende behandlingen.

Det ble ikke rapportert noen HER-2-test for pasient 01-006, men hun var formodentlig HER-2-positiv siden hun fikk Herceptin®-behandling. Pasienten var negativ for både ER og PR. Pasient 01-006 hadde 1 CTC som var positiv for EGFR-ekspresjon ved farging. Det ble detektert vesentlig aktivering av både EGFR og HER-2. Tross behandling som inkluderte Herceptin®, ble verken EGFR- eller HER-2-signalveiene stoppet. Aktivering kan skyldes dannelse av heterodimerer mellom EFGR og HER-2, hvilket tillater unngåelse av Herceptin®-inhibering. Disse dataene informerer legen om at behandlingen må endres. Behandlinger som inkluderer midler som retter seg mot både EGFR og HER-2, slik som lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa®, eller Herceptin® + Tarceva®, ville være indisert.

Pasient 02-017 testet negativt for ER-, PR- og HER-2-overekspresjon i primærtumoren. Pasienten hadde tidligere vært behandlet med adriamycin + cytoxen, men fikk ikke kreftbehandling på blodtappingstidspunktet. Prøven inneholdt 3 CTC-er, hvorav alle farget positivt for EGFR-ekspresjon. Det ble detektert vesentlig aktivering av både EGFR og HER-2 i proksimitetsassayene. Selv om primærtumoren til denne pasienten var negativ for HER-2-overekspresjon, var EGFR/HER-2-signalveiene aktive. Behandling med Herceptin®, enten alene eller i kombinasjon med kjemoterapi, eller kjemoterapi alene, ville ikke ha vært en adekvat behandling for denne pasienten. Disse dataene informerer legen om at behandling som inkluderer midler som retter seg mot både EGFR og HER-2, slik som lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa® eller Herceptin® + Tarceva®, er indisert.

Primærtumorene til pasient 01-003 og 01-014 ble rapportert i pasienthistorikkene som positive for HER-2-overekspresjon. Begge pasientene var negative for ER og PR. Pasient 01-003 ble behandlet med Herceptin® og Taxotere®, og pasient 01-014 ble behandlet med Herceptin®, karboplatin og Taxotere®. Pasient 01-003 hadde 1 CTC som var negativ for EGFR-ekspresjon ved farging. Det ble ikke detektert fosforylering av verken EGFR eller HER-2. Disse dataene informerer legen om at den HER-2-drevne signalveien opprinnelig

detektert i primærtumoren ikke lenger er aktiv. Siden prosentandelen av primærtumor som faktisk farger med HER-2-antistoff i en positivt scoret primærtumor ofte er ~10 %, er det ikke uventet at CTC-er assosiert med tilbakefall kanskje ikke overuttrykker HER-2. EGFR-signalveien er ikke aktiv. Det er ingen grunn til å behandle denne pasienten med målrettede behandlinger rettet mot verken EGFR eller HER-2. Pasient 01-014 hadde 3 CTC-er, hvorav alle farget positivt for EGFR-ekspresjon. Det ble detektert fosforylering av verken EGFR eller HER-2 for denne pasienten. Selv om CTC-er viste EGFR-ekspresjon, var ikke EGFR-signalveiene aktive. Lavere nivåer av EGFR, under fravær av HER-2, er kanskje ikke høye nok til å aktivere kreftcellene. Igjen er det ingen grunn til å behandle denne pasienten med målrettede behandlinger rettet mot enten EGFR eller HER-2.

Tabell 42 viser et sammendrag av den diagnostiske informasjonen for hver pasient og anbefalingene for behandling.

Tabell 42

Sammendrag av diagnostisk informasjon om de 5 brystkreftpasientene i studien med resulterende behandlingsindikasjoner.

Pasientnr.	**ER-status**	**PR-status**	**HER-2-status**	**CTC-nr.**	**CTC EGFR**	**pEGFR**	**pHER-2**	**Behandling indisert** (kjemoterapi kan gis i kombinasjon)
01-019	Positiv	Negativ	Negativ	4	Negativ	Negativ	Negativ	Hormonbehandling
01-006	Negativ	Negativ	Ukjent	1	Positiv	Positiv	Positiv	lapatinib,
								Herceptin® + ZACTIMA™,
								Herceptin® + Erbitux®,
								Herceptin® +

Sammendrag av diagnostisk informasjon om de 5 brystkreftpasientene i studien med resulterende behandlingsindikasjoner.								
Pasientnr.	**ER-status**	**PR-status**	**HER-2-status**	**CTC-nr.**	**CTC EGFR**	**pEGFR**	**pHER-2**	**Behandling indisert** (kjemoterapi kan gis i kombinasjon)
								Iressa®,
								Herceptin® + Tarceva®
02-017	Negativ	Negativ	Negativ	3	Positiv	Positiv	Positiv	lapatinib,
								Herceptin® + ZACTIMA™
								Herceptin® + Erbitux®,
								Herceptin® + Iressa®,
								Herceptin® + Tarceva®
01-003	Negativ	Negativ	Positiv	1	Negativ	Negativ	Negativ	(ingen EGFR- og/eller HER-2-inhibitorer)
01-014	Negativ	Negativ	Positiv	3	Positiv	Negativ	Negativ	(ingen EGFR- og/eller HER-2-inhibitorer)

Eksempel 12. Valg av pasienter for behandling med lymfeknutenegativ invasiv brystkreft i stadium I eller stadium II etter identifikasjon av risiko for tilbakefall ved hjelp av et genekspresjonspanel.

Det er utviklet paneler av genekspresjonsmarkører som predikerer sannsynligheten for brystkreftprognose og/eller -tilbakefall i forskjellige populasjoner av kvinner med for eksempel lymfeknutenegativ sykdom. Disse genpanelene kan være nyttige for identifikasjon av kvinner som sannsynligvis ikke vil oppleve tilbakefall og således sannsynligvis ikke drar fordel av adjuvant kjemoterapi. Ekspresjonspanelene kan anvendes til å identifisere kvinner som med sikkerhet kan unngå adjuvant kjemoterapi, uten å påvirke resultatene for sykdomsfri og samlet overlevelse negativt. Egnede systemer inkluderer blant annet Oncotype DX™, som er et 21-geners panel fra Genomic Health, Inc. (Redwood City, CA), MammaPrint®, som er et 70-geners panel fra Agendia (Amsterdam, Nederland) og et 76-geners panel fra Veridex (Warren, NJ). Disse panelene kan anvendes i sammenheng med analyse av signalveiaktivering for å bestemme behovet for å inkludere kjemoterapi med egnede målrettede behandlinger valgt ved hjelp av fremgangsmåtene beskrevet i foregående eksempler.

Følgende protokoll tilveiebringer et eksempel på en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen hvor genekspresjonsprofilering er anvendt i sammenheng med aktiveringsstatusprofilering for å velge egnet målrettet behandling eller kombinasjon av målrettede behandlinger for behandling av brystkreft:

1) Det tas en tumorprøve med en minste tykkelse på 3 mm og en største tykkelse på 5 mm ved hjelp av en biopsipunch. Biopsien plasseres direkte i prøveglasset inneholdende RNARetain™-konserveringsmiddel. Glasset sendes umiddelbart til Agendia for testing ved hjelp av MammaPrint®-assayet.

2) Testrapporten fra Agendia tilordner enten pasienten til en "god" signatur / lavrisikogruppe eller en "dårlig" signatur / høyrisikogruppe. Hvis pasienten er i lavrisikogruppen, kan hun med sikkerhet unngå adjuvant kjemoterapi uten å påvirke sykdomsfri og samlet overlevelse negativt.

3) MammaPrint®-assayet kan anvendes for pasienter som er enten ER-positiv eller ER-negativ. Straks ER- og ErbB2-status er bestemt, tilordnes pasienten til én av underklassene av brystkreft beskrevet i eksempel 8. De fire viktigste underklassene er følgende:

1. ER+/PR+/ErbB2-
2. ER+/ErbB2+
3. ER-/ErbB2+

4. ER-/PR-/ErbB2

4) Tumorceller (f.eks. CTC-er) isoleres fra blod og fremstilles for analyse som beskrevet i eksempel 1. En del av biopsien kan alternativt anvendes til å fremstille en tumorcelleekstrakt som beskrevet i eksempel 2. Cellefremstillingene analyseres som beskrevet i enten eksempel 3 eller eksempel 4. Aktiveringsprofilen evalueres på lignende måte som beskrevet i eksempel 8 (tabell 4–22), eksempel 9 (tabell 23–31) og eksempel 10 (tabell 32–35). Den egnede målrettede behandlingen eller kombinasjonen av målrettede behandlinger velges. Hvis pasienten er i lavrisikogruppen, tilføyes ingen kjemoterapi. Hvis pasienten er i høyrisikogruppen, tilføyes kjemoterapi valgt av legen basert på klinisk informasjon til de målrettede behandlingene.

Eksempel 13. Valg av pasienter for behandling etter bestemmelse av opprinnelig primærvev ved hjelp av et genekspresjonspanel.

Cirka 3 % til 5 % av alle metastatiske tumorer er klassifisert til kategorien kreft med ukjent primærsted (CUP). Riktig diagnose av det opprinnelige vevet er viktig for behandlingsbeslutninger fordi nåværende behandlinger stort sett er basert på anatomisk sted. Genekspresjonspaneler kan være nyttige for identifikasjon av kvinner med metastatisk kreft som ville dra fordel av behandling som samsvarer med den gitt til kvinner initialt diagnostisert med brystkreft. Egnede systemer inkluderer blant annet Rosetta Genomics CUP-assayet, som klassifiserer krefttyper og opprinnelig vev gjennom analyse av ekspresjonsmønstrene for mikroRNA-er (se for eksempel PCT-publikasjon nr. WO 08/117278), Aviara DX (Carlsbad, CA) CancerTYPE ID™-assayet, et RT-PCR-basert ekspresjonsassay som måler 92 gener for å identifisere det opprinnelige primærstedet for 39 tumortyper og Pathwork™-testen for opprinnelige vev (Sunnyvale, CA), som måler ekspresjonen av mer enn 1600 gener på et mikroarray og sammenligner en tumors "genekspresjonssignatur" mot dem for 15 kjente vevstyper. Straks pasienten er identifisert med brystet som vev for primærkreft, kan det anvendes signalveiaktiveringsprofiler til å velge egnede målrettede behandlinger som skal inkluderes i behandlingsplanen.

Følgende protokoll tilveiebringer et eksempel på en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen hvor genekspresjonsprofilering er anvendt i sammenheng med aktiveringsstatusprofilering for å velge egnet målrettet

behandling eller kombinasjon av målrettede behandlinger for behandling av brystkreft:

1) To eller flere glassplater med 7 µm tykke seksjoner av et vev fjernet, enten kirurgisk eller ved finnålbiopsi, fra en metastatisk tumor oppnås fra pasienten. Disse cellene fikseres i formalin og integrert i parafin (FFPE). Én ytterligere H&E-farget plate av samme tumor farges med H&E.

2) En patolog undersøker H&E-platen og indikerer området som skal samles for CancerTYPE ID™-assayet. Platene sendes til Aviara DX for analyse.

3) Testrapporten fra Aviara DX indikerer de 5 mest sannsynlige opprinnelsesstedene som bestemt fra en k-nærmeste nabo-analyse, og en prediksjon avledes. Hvis prediksjonen for pasienten er for brystet som tumor av ukjent opprinnelse, kan pasientens tumorceller vurderes for signalveiaktivering.

4) Tumorceller (f.eks. CTC-er) isoleres fra blod og fremstilles for analyse som beskrevet i eksempel 1. En finnålbiopsi kan alternativt anvendes til å fremstille en tumorcelleekstrakt som beskrevet i eksempel 2. Cellefremstillingene analyseres som beskrevet i enten eksempel 3 eller eksempel 4. Aktiveringsprofilen evalueres på lignende måte som beskrevet i eksempel 8 (tabell 4–22), eksempel 9 (tabell 23–31) og eksempel 10 (tabell 32–35). Den egnede målrettede behandlingen eller kombinasjonen av målrettede behandlinger velges.

Eksempel 14. Hittil ukjente sett av brystkrefttester ved hjelp av proksimitetsassayer.

Bakgrunn:

I 2008 vil det bli identifisert anslagsvis 182 460 nye tilfeller av invasiv brystkreft blant kvinner i USA. Cirka 20 % av kvinner med brystkreft har en overekspresjon av HER-2 på diagnosetidspunktet. HER-2-overuttrykte (HER-2-positive) brystkrefttyper er assosiert med mer aggressive former for kreft og resulterer derfor i dårligere overlevelsesrater og høyere tilbakefallsrater. HER-2-positive pasienter behandles ofte med det monoklonale antistoffet trastazumab (Herceptin®). Men Herceptin® er en dyr og potensielt kardiotoksisk behandling. Nøyaktig identifikasjon av kandidater er derfor avgjørende for å optimalisere kliniske resultater. Herceptin® virker ved å blokkere HER-2 og reduserer derfor

tumorcellevekst. Lapatinib (Tykerb®) er en liten molekylkinaseinhibitor som ofte anvendes for pasienter som har mislyktes med Herceptin®-behandling.

Nåværende HER-2-testingsalternativer:

HER-2 status evalueres typisk med enten eller både: (1) reseptorproteintesting ved hjelp av et immunhistokjemiassay (IHC) eller (2) genamplifikasjon ved hjelp av en FISH-testteknikk. Men det er bred enighet om at nåværende testmetoder mangler nøyaktighet og kan være svært variable fra laboratorium til laboratorium og kan variere etter forskjeller i prøvehåndtering før prøven mottas i laboratoriet. Tilgjengelig dokumentasjon antyder faktisk at cirka 20 % av nåværende HER-2-testing kan være unøyaktig (ASCO/CAP Guidelines for HER-2 Testing in Breast Cancer, J. Clin. Oncology (2007)).

Proksimitetsassaybaserte brystkrefttester:

Det hittil ukjente settet av brystkrefttester beskrevet i dette eksempelet drar fordel av de multipleksede proksimitetsassayene med høy gjennomstrømning (dvs. tre antistoffer) beskrevet heri. Slik diagnostisk testing vil være særlig nyttig for å bestemme ekspresjon og aktivering av HER-2 i sirkulerende tumorceller (CTC-er) eller finnålsaspirat (FNA) fra pasienter med brystkreft og vil bistå i valg av behandling for brystkreftpasienter.

Følgende protokoll beskriver standardformatet som anvendes for alle testene i dette eksempelet:

1. Ta blodprøve:

a. Ta to 7,5 ml glass med blod.

b. Bruk EpCAM-magnetkulene med bindingsproteiner som er spesifikke for epitelceller for å separere sirkulerende tumorceller (CTC-er) fra andre blodkomponenter.

c. Vask prøven.

2. Aktiver én prøve (bare levende celler vil bli aktivert), og lyser disse cellene.

3. Lyser den andre prøvens celler.

4. (Dette er det trinnet som er variabelt mellom hver av testene) Bruk av proksimitetsmikroarrayassayer til å detektere to proteiner (f.eks.

signaltransduksjonsproteiner) og cytokeratin i den aktiverte prøven for å kvantifisere totale aktiverte proteiner og cytokeratin:

a. Tre monoklonale antistoffer, som er spesifikke for de to proteinene og cytokeratin (CK), fikseres til mikroarrayet.

b. Prøven helles over mikroarraybrikken, slik at analyttene kan binde til de monoklonale antistoffene som er spesifikke for dem.

c. En blanding av seks ytterligere monoklonale antistoffer helles over mikroarraybrikken (to monoklonale antistoffer per analytt). For at det skal forekomme fluorescens på stedet for en analytt, må alle de tre spesifikke monoklonale antistoffene (det ene faste antistoffet og de to helte antistoffene) binde til den aktuelle analytten.

5. Proteinmikroarrayanalyse av de to proteinene i den inaktiverte prøven for å kvantifisere totalt protein.

6. Hvert aktivert protein-resultat kalibreres med den inaktiverte prøven. Dette vil gi kvantitative proteinresultater med et "+"- eller "-"-resultat for hver av de tre analyttene.

Produkt A [Herceptin®]: Denne testen er et baseline ErbB-aktiveringsassay for å detektere HER-2-aktivering/-fosforylering. Denne testen er også et forsterket ErbB-aktiveringsassay til anvendelse hos stadium III- og IV-pasienter for å bestemme HER-2-avvik. Proksimitetsmikroarrayassayer utføres for å detektere ErbB1/HER-1, ErbB2/HER-2 og cytokeratin i den aktiverte prøven for å kvantifisere totale aktivert proteiner og cytokeratin. Det anvendes monoklonale antistoffer mot ErbB1/HER-1 og ErbB2/HER-2, mens det anvendes et pancytokeratinantistoff for epitelceller. Det kvantitative signalet beskriver nivåer av HER-2- og HER-1-proteinaktivering og -ekspresjon. Det relative aktiveringsresultatet er avledet av et forhold mellom fosforylering og ekspresjon. Testen kvantifiserer: HER-2-aktivering (fosforylering), HER-2-ekspresjon, HER-1-aktivering (fosforylering), HER-1-ekspresjon og pancytokeratin (for celleantallnormalisering). Testen har høy sensitivitet siden HER-2-aktivering er detektert i enkle sirkulerende tumorceller. Testen har også en spesifisitet på ≥ 99 % som målt ved kryssreaktivitet på mindre enn 1 % med andre markører. Reproduserbarhet (intra-assay): CV = 5–15 %. Reproduserbarhet (inter-assay): CV = 10–20 %. Testrapporten tilveiebringer følgende: (1) HER-2- og HER-1-fosforylering, rapportert som en kvantitativ mengde og som positiv eller negativ, (2) HER-2- og HER-1-ekspresjon, rapportert som en kvantitativ mengde og som

positiv eller negativ og (3) cytokeratinkvantifisering. Hvis HER-1- eller HER-2-nivåene er normale, men cytokeratinnivåene er høye, ville dette diagnostisere brystkreft, men ikke indikere anvendelse av HER-1- eller HER-2-målrettede behandlinger.

Produkt B [Tykerb® Rule-in Test]: Denne testen er et forsterket ErbB-aktiveringsassay som inkluderer detektering av p95HER-2 og EGFR. Nærmere bestemt er dette en rule-in-test for lapatinib (Tykerb®)-behandling for HER-2-positive pasienter som mislyktes med behandling med Herceptin®. Denne testen bistår i valg og overvåkning av Herceptin®-pasienter og i overføring av pasienter fra Herceptin®- til Tykerb®-behandling. Proksimitetsmikroarrayassayer utføres for å detektere ErbB1/HER-1, p95HER-2 og cytokeratin i den aktiverte prøven for å kvantifisere totale aktiverte proteiner og cytokeratin. Det anvendes monoklonale antistoffer mot ErbB1/HER-1 og p95HER-2, mens det anvendes et pancytokeratinantistoff for epitelceller. Testen kvantifiserer: p95-HER-2-aktivering (fosforylering), p95-HER-2-ekspresjon, HER-1-aktivering (fosforylering), HER-1-ekspresjon og pancytokeratin (for celleantallnormalisering). Denne testen kan valideres i en klinisk utprøving av metastatiske pasienter med p95-HER-2-sykdom som tidligere ble tilordnet som HER-2-positive basert på IHC eller FISH, og som mislyktes med Herceptin®. Pasienter som demonstrerer aktivering av p95-HER-2 og HER-1 basert på proksimitetsassayet, kan behandles med Tykerb®. Utprøvingen vil vise en fordel i samlet overlevelse blant p95-HER-2-positive pasienter behandlet med Tykerb®. Siden p95HER-2 mangler det Herceptin®-bindende ekstracellulære domenet til HER-2, ville høye p95HER-2-nivåer utelukke Herceptin® og indikere anvendelse av Tykerb® i stedet. Men hvis HER-1- eller HER-2-nivåene er normale, men cytokeratinnivåene er høye, ville denne diagnostisere brystkreft, men ikke indikere anvendelse av HER-1- eller HER-2-målrettede behandlinger.

Figur 18 illustrerer flere punkter hvor fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes til å påvirke klinisk praksis med hensyn til valg av den egnede brystkreftbehandlingen for en særlig pasient.

Eksempel 15. Fremstilling av sulfhydrylaktivert dekstran.

Dette eksempelet beskriver en protokoll for å inkorporere frie sulfhydrylgrupper i et dekstranmolekyl. Som illustrert i eksempel 16 kan de sulfhydrylmodifiserte dekstranmolekylene anvendes til å fremstille konjugater med et antistoff og glukoseoksidase (GO) til anvendelse ved enkeltdeteksjons- og proksimitetsassayene beskrevet heri. I noen utførelsesformer kan et sulfhydrylaktivert 500 kDa dekstranmolekyl være konjugert til et antistoff og GO, slik at forholdet mellom antistoff : GO : dekstran er 2 : 12 : 1. Konjugeringen av et sulfhydrylaktivert 500 kDa dekstranmolekyl til antistoffet og GO forbedrer med fordel assayets sensitivitet cirka 10 ganger. I andre utførelsesformer kan et sulfhydrylaktivert 70 kDa dekstranmolekyl være konjugert til et antistoff og pepperrotperoksidase (HRP).

Definisjoner og forkortelser:

1. Dekstran = en glukosepolymer
2. Saltsyre = HCl
3. N-(3-dimetylaminopropyl)N'-etylkarbodiimidhydroklorid = EDC
4. Fosfatbufret saltløsning = PBS
5. Natriumhydroksid = NaOH
6. 2-morfolinetansvovelsyre = MES
7. Etylendiamintetraeddiksyre = EDTA

Instrumenter og utstyr:

1. Vannbad (Fisher, Isotemp 210)
2. ELISA-plateleser (Molecular Devices, SpectraMAX1900)
3. ELISA-platevasker (Nunc, Nunc-Immuno Wash 8)
4. Vortekser (Fisher, Vortex Mixer)
5. Frysetørker (Virtis, Freezemobile 12)
6. Sentrifuge (Beckman, GS-6R)
7. Magnetrører (Coming, PC-410D)
8. Utstyr til å generere NANOpure-vann (Barnstead, NANOpure Dlamond)
9. Dialysekassett (Pierce, 66380)

Reagenser, kjemikalier og forbruksvarer:

1. 500 kDa dekstran (Fisher, BP1580-100)
2. Bromeddiksyre (Sigma, 259357)
3. Natriumhydroksid (Fisher, S318-500)

4. Isopropanol (Fisherr, A451-4)
5. 12 N saltsyre (Fisher, en 144-500)
6. Cysteamin (Sigma, M9768)
7. N-(3-dimetylaminopropyl)N'-etylkarbodiimidhydroklorid (Pierce, 22980)
8. Fosfatbufret saltløsning (Cellgro, 21-040-CV)
9. 0,5 M etylendiamintetraeddiksyreløsning (GIBCO, 15575-038)
10. 2-morfolinetansvovelsyre (Fluka, 69892)
11. 10 X fosfatbufret saltløsning (Fisher, BP399-500)

Buffere og løsninger:

1. 2,9 M NaOH: Løs opp 5,8 g natriumhydroksid i 50 ml Nanopure-vann.
2. 50 mM MES-bufferløsning: Løs opp 5,33 g 2-morfolinetansvovelsyre i 500 ml NANOpure-vann, og juster pH-verdien til 4,5 ved hjelp av 12 N HCL.
3. Dialysebuffer: Tilsett 10 ml 0,5 M EDTA-løsning og 100 ml 10X PBS til 890 ml Nanopure-vann for å fremstille en sluttkonsentrasjon på 5 mM EDTA i PBS.

Prosedyre:

<u>Inkorporering av karboksylgrupper i dekstran:</u>

1. Til ett gram 500 kDa dekstran (2 µmol) oppløst i 8,5 ml 2,9 M NaOH i et 50 ml prøveglass med skrukork av polypropylen tilsettes 850 mg bromeddiksyre. Etter omhyggelig blanding på vortekser inkuberes glasset i et 50 °C vannbad over natten.
2. Etter inkubering tilsettes isopropanol til reaksjonsblandingen til en sluttkonsentrasjon på 70 vol-% for å felle ut det karboksylerte dekstranet. Etter blanding på en vortekser roteres løsningen ved 3000 o/min i en Beckman-sentrifuge ved romtemperatur i 15 min, og supernatanten forkastes.
3. Presipitatet oppløses på nytt i 10 ml Nanopure-vann, og utfellingen med isopropanol gjentas to til tre ganger til inntil det oppnås ingen utfelling med tilsatt isopropanol. Den klare 70 % isopropanolløsningen justeres deretter til pH 4 med 12 N HCl med vortekser for å regenerere presipitatet, og blandingen roteres igjen ved 3000 o/min i Beckman-sentrifugen i 15 min for å felle ut det karboksylerte dekstranet, og supernatanten forkastes.
4. For å fjerne den resterende bromeddiksyren oppløses presipitatet på nytt i 10 ml Nanopure-vann, og løsningens pH-verdi justeres til 4 med HCL. Isopropanol tilsettes deretter til 70 volum-% for å felle ut det karboksylerte

dekstranet. Etter blanding på en vortekser roteres løsningen ved 3000 o/min i en Beckman-sentrifuge i 15 min, og supernatanten forkastes. Denne vaskeprosessen gjentas i alt tre ganger.

5. Etter den siste vasken oppløses presipitatet igjen i 10 ml Nanopure-vann, og løsningen frysetørkes til tørrhet i frysetørkeren for å fjerne HCl.

6. Det frysetørkede karboksylerte dekstranet oppbevares ved –70 °C.

Omdannelse av karboksylgruppene på det karboksylerte dekstranet til sulfhydrylgrupper:

1. Løs opp 10 mg frysetørket karboksylert dekstran i 0,5 ml 50 mM MES-buffer, pH 4,5 i et 2 ml brunt glass.

2. Til den karboksylerte dekstranløsningen tilsettes det 1,42 mg EDC, og blandingen omrøres ved 40 °C i 30 min.

3. Ti milligram cysteamin tilsettes deretter til blandingen, og den resulterende løsningen omrøres i én time til ved 4 °C.

4. Etter omrøring overføres blandingen til en 0,5–3,0 ml dialysekassett med en molekylvekt-cutoff på 10 000 og dialyseres mot 500 ml PBS, pH 7,4, ved 4 °C over natten.

5. Dialysebufferen endres deretter til 5 mM EDTA/PBS og dialyseres i to timer til. Dialyseprosessen gjentas én gang til.

6. Det samlede antallet av sulfhydrylgrupper inkorporert i hvert 500 kDa dekstranmolekyl bestemmes ved Ellmans assay.

7. Det fremstilles femti mikroliter alikvoter av den sulhydrylinkorporerte dekstranløsningen i 1 ml Eppendorf-glass, og alikvotene frysetørkes. De frysetørkede alikvotene oppbevares ved –70 °C.

Eksempel 16. Fremstilling av et HER-2-antistoff-glukoseoksidase-dekstran-konjugat.

Dette eksempelet beskriver en fremgangsmåte for å konjugere et ekstracellulært domene-rettet HER-2-antistoff og glukoseoksidase (GO) til et sulfhydrylaktivert 500 kDa dekstranmolekyl. HER-2-antistoff-GO-dekstran-konjugatet kan anvendes i enkeltdeteksjons- og proksimitetsassayer beskrevet heri.

Definisjoner og forkortelser:

1. Suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksyl-(6-amidokaproat) = LC-SMCC
2. Dimetylsulfoksid = DMSO
3. Natriumhydroksid = NaOH
4. Konsentrert saltsyre = HCl
5. Fosfatbufret saltløsning = PBS
6. Etylendiamintetraeddiksyre = EDTA
7. 2-(etylmerkuriomerkapto)benzosyrenatriumsalt = Thimerosal
8. HPLC = høyytelsesvæskekromatografi

Instrumenter og utstyr:

1. HPLC-system (Agilent Technologies; Series 1100)
2. Størrelseseksklusjonskromatografikolonne (Phenomenex; BioSep-SEC-S 3000)
3. Spektrofotometer (Hitachi; U-200)
4. Sentrifuge (Beckman; GS-6R)
5. Magnetrører (Coming; PC-410D)
6. ELISA-plateleser (Molecular Devices; Spectra MAX 190)
7. Vortekser (Fisher Scientific; 02-215-365.)
8. Avsaltingskolonne (Pierce, 43230)
9. Centricon YM-10-apparat (Millipore, 4205)
10. 1 ml pipette (Rainin, L-1000)
11. 200 µl pipette (Rainin, L-200)
12. 20 µL pipette (Rainin, L-20)
13. 2 µl pipette (Rainin, L-2)
14. Multikanalpipette (Rainin, L8-200)

Reagenser, kjemikalier og forbruksvarer:

1. Anti-humant monoklonalt HER-2-antistoff fra mus ved 1 mg/ml i PBS (Lab Vision; MS-301-PABX)
2. Dialysert glukoseoksidase (Prometheus)
3. Sulfhydrylaktivert dekstran (Prometheus)
4. LC-SMCC = suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)sykloheksan-1-karboksyl-(6-amidokaproat) (Fisher; 22362)
5. DMSO = dimetylsulfoksid (Sigma; D2650)
6. Bovint serumalbumin (Sigma; A3294)

7. Natriumhydroksid (Fisher, S318)
8. Konsentrert saltsyre (Fisher, A144-500)
9. PBS = fosfatbufret saltløsning (Cellgro, 21-040-CV)
10. 0,5 M etylendiamintetraeddiksyreløsning (EDTA-løsning) (Invitrogen; 1758)
11. Thimerosal (Sigma, T8784)

Buffere og løsninger:

1. Avgasset 5 mM EDTA/PBS-buffer, pH 7,2: Tilsett 2 ml 0,5 M EDTA-løsning til 200 ml PBS, og få deretter argongass til å boble inn i den resulterende løsningen i 5 min for å fjerne alle de andre gassene i løsningen.
2. 10 % BSA/PBS-løsning: Løs opp 100 mg BSA i 10 ml PBS, og filtrer løsningen gjennom et 0,2 µm filter. Løsningen oppbevares i fryseren ved -20 °C.
3. 10 % Thimerosal/PBS-løsning: Løs opp 100 mg Thimerosal i 10 ml PBS, og filtrer løsningen gjennom et 0,2 µm filter. Løsningen oppbevares i fryseren ved -20 °C.
4. 0,1 M PB (fosfatbuffer), pH 6,8.

Prosedyre:

<u>Fremstilling av LC-SMCC-løsningen for umiddelbar bruk i aktiveringsreaksjonen:</u>

1. Ta en flaske LC-SMCC ut av fryseren (-20 °C), og la den bli romtemperert.
2. Vei opp mellom 1 og 2 mg LC-SMCC i et 1,5 ml Eppendorf-glass, og tilsett riktig volum av DMSO for å fremstille en 4,5 mg/ml løsning (10 mM LC-SMCC). Sett det resterende LC-SMCC til oppbevaring i fryseren igjen.

<u>LC-SMCC-aktivering av HER-2-antistoffet:</u>

1. Tilsett 2,3 µl 10 mM LC-SMCC-løsning til 0,5 ml HER-2-antistoffløsning, som inneholder 500 µg antistoff, og bland umiddelbart på vortekser for å starte reaksjonen. Etter blanding på vortekser holdes blandingen ved romtemperatur for å fortsette reaksjonen i 30 min.
2. Forhåndsekvilibrer imens en avsaltingskolonne ved å vaske den med 50 ml avgasset 5 mM EDTA/PBS-buffer.
3. Etter at aktivering av HER-2-antistoffet med LC-SMCC er fullført, lastes aktiveringsblandingen på avsaltingskolonnen, og kolonnen elueres med avgasset 5 mM EDTA/PBS-buffer ved romtemperatur. Den eluerte løsningen samles opp

ved 0,5 ml fraksjoner og overvåkes ved UV-absorbans ved 280 nm med et spektrofotometer.

4. Fraksjonene inneholdende det aktiverte antistoffet basert på UV-absorbansen blandes og oppbevares på is til neste reaksjon.

LC-SMCC-aktivering av glukoseoksidase:

1. Ta 0,16 ml dialysert glukoseoksidase, som inneholder 4 mg enzym, og juster volumet til 0,5 ml med den avgassede 5 mM EDTA/PBS-bufferen.

2. Tilsett 12,4 µl 10 mM LC-SMCC-løsning til 0,5 ml glukoseoksidaseløsning, og bland umiddelbart på vortekser for å starte reaksjonen. Etter blanding på vortekser holdes blandingen ved romtemperatur for å fortsette reaksjonen i 30 min.

3. Forhåndsekvilibrer imens en avsaltingskolonne ved å vaske den med 50 ml avgasset 5 mM EDTA/PBS-buffer.

4. Etter at aktivering av glukoseoksidasen med LC-SMCC er fullført, lastes aktiveringsblandingen på avsaltningskolonnen, og kolonnen elueres med avgasset 5 mM EDTA/PBS-buffer ved romtemperatur. Den eluerte løsningen samles opp ved 0,5 ml fraksjoner og overvåkes ved UV-absorbans ved 280 nm med et spektrofotometer.

5. Fraksjonene inneholdende den aktivert glukoseoksidasen basert på UV-absorbansen blandes og oppbevares på is til neste reaksjon.

Konjugering av det aktiverte HER-2-antistoffet og den aktiverte glukoseoksidasen til sulfhydrylaktivert dekstran:

1 Til en frysetørket 1 mg alikvot av sulfhydrylaktivert dekstran tilsettes 50 µl Nanopure-vann for å fremstille en løsning på 20 mg/ml sulfhydrylaktivert dekstran.

2 Til den blandede aktiverte antistoffløsningen tilsettes et volum av den kombinerte aktiverte glukoseoksidaseløsningen som tilsvarer 3 mg glukoseoksidase, etterfulgt av 34,3 µl sulfhydrylmodifisert dekstranløsning for å gi et tilnærmet molforhold mellom antistoff : glukoseoksidase : dekstran som 2 : 12 : 1. Etter blanding på vortekser holdes blandingen ved 4 °C over natten.

3 De overskytende sulfhydrylgruppene på det modifiserte dekstranet blokkeres ved tilsetning av 56,4 µl av et 1 mg/ml N-etylmaleimid i avgasset 0,5 mM EDTA/PBS-buffer, og blokkeringsreaksjonen fortsatte i 3 timer ved 4 °C.

Rensing av HER-2-antistoff-glukoseoksidase-dekstran-konjugatet:

1. Etter blokkeringsreaksjonen konsentreres HER-2-antistoff-glukoseoksidase-dekstran-konjugat-løsningen til ~300 µl i et Centricon-apparat utstyrt med en YM-10-membran for cutoff ved 10 000 molekylvekt.
2. Den konsentrerte løsningen overføres til et 1,5 ml Eppendorf-glass, og glasset roteres ved 16 000 g i 3 min for å fjerne den lille presipitatmengden.
3. Supernatanten overføres til et HPLC-prøveglass, og løsningens volum justeres til 320 µl med den avgassede 5 mM EDTA/PBS-bufferen for rensing ved HPLC.
4. Ett hundre mikroliter konjugert løsning injiseres på en BioSep-SE-S 300-størrelseseksklusjonskolonne i et Agilent HPLC-system, og det konjugerte proteinet separeres ved eluering med 0,1 M PB, pH 6,8 ved en strømningshastighet på 0,5 ml/min i 40 min, og den eluerte løsningen overvåkes med UV-absorbans på 280 nm.
5. Den første UV-absorpsjonstoppen fra elueringsfraksjonene blandes og oppbevares på is.
6. De resterende 200 µl av den konjugerte løsningen renses også likeledes, og alle de første UV-absorpsjonstoppene fra de tre HPLC-analyseseriene blandes sammen. Den blandede konjugerte løsningen justeres til 0,1 % BSA med 10 % BSA/PBS-løsning og 0,02 % Thimerosal med 10 % Thimerosal/PBS-løsning for langsiktig oppbevaring ved -70 °C.
7. Den enzymatiske glukoseoksidaseaktiviteten i HER-2-antistoff-glukoseoksidase-dekstran-konjugatet bestemmes ved et funksjonelt glukoseoksidaseassay.
8. Antistoffaktiviteten i HER-2-antistoff-glukoseoksidase-dekstran-konjugatet bestemmes ved et kompetitivt ELISA-assay.

Eksempel 17. Hittil ukjent multiplekset assay for å detektere aktivering av reseptortyrosinkinaser i ErbB-familien i en sirkulerende tumorcelle.

Sammendrag:

Ekspresjons-/aktiveringsprofilering av kinaser og andre signaltransduksjonsveimolekyler ved en seriell prøvetaking av tumorvev tilveiebringer verdifull informasjon om endringer som skjer i tumorceller som en funksjon av tid og behandlinger. Denne tidsprofileringen av tumorprogresjon gir leger mulighet til å overvåke hurtig utviklende kreftsignaturer hos hver pasient. Dette eksempelet illustrerer et hittil ukjent og robust assay for å detektere ekspresjonsnivået og fosforyleringsgraden for ErbB-familien av reseptortyrosinkinaser (RTK-er) og viser fordelen med å anvende et slikt behandlingsveiledende diagnostisk system med enkeltcellenivåsensitivitet. Assayet er generelt avhengig av prøver slik som finnålsaspirater (FNA-er) og blod og oppnår høy sensitivitet og spesifisitet for undersøkelse av den begrensede mengden av kreftceller oppnådd fra slike prøver.

Innledning:

Kreftforekomst og -progresjon kan være assosiert med abnormt regulert ekspresjon og aktivering av reseptorer og andre komponenter i signaltransduksjonsveien. Den abnorme aktiveringen av HER-1 og HER-2 har vært bundet til forskjellige typer av kreftprogresjon. Fremgangsmåter for profilering av HER-1- og HER-2-fosforyleringsmønstre kan gi verdifull innsikt i den totale sykdomspatogenesen og derfor føre til et bedre behandlingsvalg ved identifikasjon av relevante sykdomsforårsakende molekyler. Assayet beskrevet heri er basert på (1) en multiplekset proteinmikroarrayplattform kombinert med (2) en trippelantistoff-enzym-kanaliserende signalamplifikasjonsprosess. Mikroarrayplattformen tilbyr den ekspandabilitet som kreves for å få plass til flere markører, og den skalerbarhet som kreves for kommersiell bruk. Den unike og hittil ukjente utformingen av assayet beskrevet heri tilveiebringes ved trippelantistoff-enzym-metoden som overfører ultrahøy sensitivitet mens spesifisiteten beholdes. I utførelsesformer hvor assayet anvendes til å detektere og kvantifisere de målene som er fosforylert, og derfor aktivert, kan assayet utføres på følgende måte:

1. Det valgte målet innfanges av målspesifikke antistoffer skrevet i seriefortynninger på en mikroarrayoverflate. Figur 19 illustrerer én utførelsesform av assayet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, som er avhengig av samtidig lokalisering av to ytterligere detektorantistoffer bundet med enzymer for etterfølgende kanaliseringshendelser for hvert bundet målprotein.

2. I utførelsesformen vist på figur 19 produserer immunkomplekset dannet av den initiale målbindingen ved hjelp av innfangingsantistoffer og den sekundære bindingen av GO-konjugerte antistoffer som gjenkjenner et alternativt epitop på de innfangne målmolekylene, H_2O_2 under nærvær av et GO-substrat slik som glukose. GO er ett av de hurtigste kjente enzymene, med et TON på 10^5/min.
3. I utførelsesformen vist på figur 19 benyttes den målspesifikke lokale innstrømningen av H_2O_2 deretter av fosfopeptidspesifikke antistoffer konjugert til pepperrotperoksidase (HRP, med et TON på 10^4/min) som binder til det fosforylerte stedet på de innfangne målene, hvorved det målspesifikke signalet amplifiseres. Spesifisitet for detektering av fosforylerte mål økes betydelig gjennom den kollaborative immundeteksjons- og amplifikasjonsprosessen i og med kravet til samtidig binding av tre forskjellige typer av antistoffer.

Detektering og kvantifisering av så få som cirka 2–3 x 10^4 fosforyleringshendelser oppnås rutinemessig ved hjelp av assayet beskrevet heri og bringer dets detektering til et enkeltcellenivå. Denne kollaborative immunassaykonfigurasjonen kan videre anvendes til å undersøke proteininteraksjoner og aktiveringsstatus.

Fremgangsmåter:

Vevskultur: SKBR3-, MDA-MB-468-, T47D- og BT474-cellelinjer ble oppnådd fra ATCC. Cellene ble dyrket i følgende vekstmedier i 100 mm vevskulturplater ved 37 °C i 5 % CO_2: SKBR3 – MacCoys 5A-medium med 10 % FBS, MDA-MB-468 – DMEM, 10 % FBS, BT474 – DMEM, 10 % FBS, T47D – RPMI 1640, 10 % FBS, 0,2 U/ml bovint insulin. Cellene ble høstet ved 70–80 % konfluens med forsiktig løsning (trypsinbehandling + etterfølgende inaktivering) og ble deretter talt og vasket med 1X PBS. Cellestimulering ble utført med 100 µM EGF eller 20 µM heregulin β eller begge i serumfrie vekstmedier i 5 min. Stimulerte celler ble deretter vasket med 1 X PBS og deretter lysert og oppbevart på is i 30 min.

Plateskriving: Innfangingsantistoffer ble fortynnet i 1 x PBS med detergent. En kontaktmikroarrayskriver (Genetix) ble benyttet til å skrive på 16 felters nitrocellulosebelagte FAST-plater (Whatman). Punktdiameteren var cirka 175 µm, og de skrevne platene ble oppbevart i et tørket kammer ved 4 °C.

Multiplekset proksimitetsassay: Platene ble inkubert med blokkeringsbuffer i 1 t og deretter vasket 3 X med TBST-buffer. Det ble deretter tilsatt cellelysater på hvert felt for inkubering over natten ved romtemperatur. Etter at den primære bindingen var fullført, ble lysatene aspirert, og deretter ble hvert felt vasket flere ganger med TBST. Sekundære detektorantistoffer (konjugert med GO eller HRP) ble deretter tilsatt til hvert felt i 2 t ved romtemperatur. Ubundne sekundære detektorantistoffer ble fjernet ved vasking med TBST, og signalamplifikasjonsbuffer inneholdende glukose og biotinylert tyramid ble tilsatt til hvert felt i 15 min etter fjerning av overskytende biotinylert tyramid, Alexa-647-konjugert strepavidin ble tilsatt for signaldetekteringen.

Dataanalyse: Kvantifisering ble utført ved hjelp av Perkin Elmer ScanArray Express-programvaren, og de oppnådde dataene ble korrigert for lokal og global bakgrunnsintensitet. En GenePixArray List (GAL)-fil ble anvendt for å tilveiebringe beskrivende navn- og identifikatorinformasjon og ble inkorporert i bildeanalysefilen. Gjennomsnittet av signaler fra tredobbelte punkter ble beregnet, og dataene ble normalisert for å korrigere for variabilitet fra felt til felt. Det ble anvendt en ikke-lineær regresjonsmodell for kvantifisering av celleekvivalent mengde for tilsvarende RFU-verdier. Dataene ble tilpasset til en fem parameters Hill-ligning for å generere standardkurvene. Hver kurve ble validert mot kjente kontroller. Et kjent antall av celler ble predikert for den egnede fortynningen, tilsvarende kurven med den høyeste hellingen ved den kjente prøvens intensitet.

Western blotting: Etter at det var oppnådd nokså like antall av cellelysater for hver cellelinje, ble de alikvotert til engangsglass. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved hjelp av et BCA-proteinassay. Det ble fremstilt prøver med prøvebuffer inneholdende β-merkaptoetanol, og etter koking i 5 min og kjøling til RT ble prøvene lastet på en NuPage 4–12 % gel sammen med en proteinstige. Etter fullført elektroforese ble de separerte proteinene i gelen overført til en nitrocellulosemembran. Membranen ble vasket, blokkert med 5 % melkblotto og inkubert først med primære og deretter med sekundære antistoffer før deteksjonsprosessen ved hjelp av NBT/BCIP.

Resultater:

Sensitivitet: Det ble detektert aktivering og ekspresjon av HER-1 og HER-2 ved et sensitivitetsnivå for en enkelt celle i flere cellelinjer (MDA-MB-468-, A431-, BT-474- og SKBr-3-cellelinjer). Disse cellelinjene uttrykker cirka 1 x 10^6 totale RTK-er på sin cellemembran per celle, selv om bare subsett av de totale RTK-er blir fosforylert og slik fosforylering er påkrevd for signalveiaktivering. SKBR-3-cellene har spontan HER-2-aktivering på grunn av sin amplifikasjon, og de tilveiebringer derfor en positiv kontrollreferanse. MDA-MB-468-celler må stimuleres med EGF (TGF-a) for å indusere HER-1-fosforylering, og deres signatur før og etter stimulering kan anvendes som negative og positive kontroller. MDA-MB-468 har marginal HER-1-aktivering før stimulering, mens begge cellelinjene når toppen med cirka 2–5 % av sine RTK-er aktivert (~0,5 til 1 x 10^5 fosforyleringshendelser per celle). Figur 20 viser at assayformatet beskrevet heri sikrer detektering av mindre enn 10^5 aktiveringshendelser med enkeltcellesensitivitet.

Spesifisitet: Analytisk spesifisitet for det kollaborative immunassayformatet beskrevet heri var > 99,99 % basert på en komparativ studie utført på flere cellelinjer med forskjellige RTK-nivåer. De anvendte cellelinjene og deres dominante ErbB-ekspresjon og RTK-aktiveringen ved EGF- eller HRG β-stimulering er vist i Western blotting på figur 21. RTK-aktiveringsprofilen for T47D-celler, som uttrykker noe nivå av ErbB2 og ErbB3, men en ekstremt lav mengde av ErbB 1, vises på figur 22. Antallet av celler som kreves for å detektere EC20 (12 000 RFU) pHER-1 eller pHER-2, ble anvendt til å beregne RTK-aktivering per celle (RFU/celle) som vist i tabell 43. Når det ble anvendt MB468-celler som uttrykker en ekstremt lav mengde av HER-2, var det ikke tilstrekkelig å ha ~1000 celler per reaksjonsfelt til å oppnå EC20, og denne typen av lavt eller ikke-detekterbart signal i andre cellelinjer var angitt som "ND" i tabell 43. MDA MB 468-celler har et pHER-1-nivå på ~4000 RFU/celle når de stimuleres med EGF, men viser ikke noe detekterbart pHER-2. Dette kollaborative immunassayformatet sikrer ultraspesifisitet og opprettholder samtidig sin molekylnivåassaysensitivitet på under enkeltcellenivå (10^4 til 10^5).

Tabell 43

	Relativt nivå av ErbB-ekspresjon			**Per celle-RTK-aktivering (RFU/celle)**			
	ErbB1	**ErbB2**	**ErbB3**	**EGF**		**HRG**	
				pHER1	**pHER2**	**pHER1**	**pHER2**
MDA MB 468	**10**	**–**	**2**	**4000**	**–**	**4000**	**–**
BT 474	–	**10**	**3**	**96**	**1200**	**–**	**1200**
T47D	–	**2**	**4**	**60**	**80**	**–**	**165**
SKBR3	**3**	**10**	**2**	**360**	**1334**	**105**	**353**

Konklusjon:

Dette eksempelet illustrerer et hittil ukjent assay som er i stand til spesifikt å detektere fosforyleringsstatus for reseptormedlemmer av ErbB-familien med sensitivitet som sikrer anvendelse med sjeldne sirkulerende tumorceller (CTC-er). Ved identifikasjon av HER-1- og HER-2-aktivering i CTC-er kan denne assayplattformen gi veiledning, ikke bare i initialt valg av målrettet behandling, men også i etterfølgende overvåkning for behandlingsprogresjon. Ekspresjons-/aktiveringsprofilering av kinaser og andre signaltransduksjonsveimolekyler (vist på figur 23) ved en seriell prøvetaking av CTC-er vil gi verdifull informasjon om endringer som skjer i tumorceller som en funksjon av tid og behandlinger. Denne behandlingsveiledende diagnostiske metoden kan tas i bruk på forskjellige stadier av sykdomshåndteringen, som vist på figur 18. Tids- og romprofileringen av tumorprogresjon tilveiebrakt ved hjelp av assayformatet beskrevet heri vil sette leger i stand til å overvåke hurtig utviklende kreftsignaturer hos hver pasient. På grunn av sin uforlignelige sensitivitet og spesifisitet kan assayformatet beskrevet i dette eksempelet anvendes til å detektere fosforyleringshendelser hos reseptormedlemmer i ErbB-familien som er til stede i sjeldne CTC-er. Denne fremgangsmåten kan således gi veiledning, ikke bare i initialt valg av målrettet behandling, men også i etterfølgende overvåkning for behandlingsprogresjon.

Den multipleksede proksimitetsbaserte kollaborative immunassayplattformen beskrevet heri tilveiebringer alt i alt verdifull klinisk informasjon om begrensede prøver med ultrasensitivitet og spesifisitet for å hjelpe onkologer med å opprettholde eller justere sykdomsbehandlingsalternativene for hver pasient ifølge en "personlig" kreftprofilendring.

Eksempel 18. Fremgangsmåte for å detektere aktivering av reseptortyrosinkinaser i ErbB-familien.

Søknaden presenterer teknologi som er i stand til spesifikt å detektere fosforyleringshendelser i reseptortyrosinkinaser (RTK-er) i ErbB-familien ved en sensitivitet på enkeltcellenivå. I visse aspekter benytter denne multipleksede proteinmikroarrayplattformen dannelse av et unikt "trippel-antistoff-enzym-kanaliserende" immunkompleks. I én utførelsesform krever dette komplekset samtidig lokalisering av to detektorantistoffer konjugert med tilsvarende kanaliserende enzymer straks målproteinene er bundet av innfangingsantistoffene. Kanaliseringshendelsene mellom to nærliggende detektorenzymer, glukoseoksidase (GO, konjugert til anti-RTK-antistoffer) og pepperrotperoksidase (HRP, konjugert til anti-fosforylerte steder i RTK-er) sikret profilering av RTK med ekstrem sensitivitet. Dette prinsippet ble anvendt på to brystkreftmodellsystemer med et begrenset antall av målceller: kreftceller detektert i en pasients fullblod (sirkulerende tumorceller, CTC-er) og i en prøve av finnålsaspirat (FNA).

Her rapporterer vi den vellykkede detekteringen av aktivering (fosforylering) av HER1 og HER2 (pHER1 og pHER2) i et CTC-modellsystem, ved et sensitivitetsnivå for en enkelt celle for MDA-MB 468- og SKBr-3-cellelinjene. Den analytiske spesifisiteten for "proksimitetsimmunassay"-formatet var > 99,99 % basert på komparative studier utført på flere cellelinjer med forskjellige RTK-nivåer. Også presentert heri er dessuten xenograftmodeller for forskjellige typer av brystkreft ved hjelp av cellelinjer med varierende grad av ErbB-RTK-ekspresjon (MDA-MB-231, MDA-MB-468 og MDA-MB-435) for å demonstrere den potensielle anvendelsen med FNA-prøver (og metastatiske FNA-prøver). Mens det var mulig å detektere moderate nivåer av pHER2 og pHER1 i MD-MB-231-xenograft-FNA og signifikant pHER1 i FNA oppnådd fra MDA-MB-468-xenografter, ble det detektert ingen HER1- eller HER2-aktivering i FNA oppnådd

fra MDA-MB-435-xenografter. Disse funnene fra xenograft-FNA-modellsystemet samsvarer med drivercellelinjeprofilen og demonstrerer at denne fremgangsmåten kan anvendes til å detektere aktivering av ErbB-reseptorer i en hvilken som helst type av prøve oppnådd fra minimalinvasive fremgangsmåter (f.eks. fra CTC-er til FNA-er).

Dette assayets evne til å overvåke aktiveringsstatus for de målrettede RTK-ene med en begrenset prøvemengde er ekstremt nyttig siden de målrettede behandlingenes suksess avhenger av legemiddelets evne til å skru av (eller defosforylere) målrettede RTK-er. Dette prinsippet kan videre anvendes til å undersøke andre signaltransduksjonsveimolekyler for bedre behandlingsvalg og effektiv sykdomsovervåkning blant tilgjengelige brystkreftbehandlingsalternativer. Siden sykdomsprofilen ofte endrer seg ved tilbakevendende brystkreft, kan dette unike assayformatet benyttes til å tilveiebringe verdifull klinisk informasjon om begrensede prøver oppnådd fra en "utviklende sykdom" for å hjelpe onkologer med å justere sykdomsbehandlingsalternativene for hver pasient ifølge en "personlig" kreftprofilendring.

Eksempel 19. Fremgangsmåte for å detektere aktivering av reseptortyrosinkinaser i sirkulerende tumorceller ved hjelp av et proksimitetsmediert mikroarrayimmunassay.

Bakgrunn: Den abnormale aktiveringen av HER1 og HER2 har vært bundet til forskjellige typer av kreftprogresjon, og endringene i deres ekspresjonsstatus mellom primærtumor og sirkulerende tumorceller (CTC-er) er rapportert å forekomme med en vesentlig hyppighet. Fremgangsmåter for detektering av HER1- og HER2-fosforylering i serielt innsamlede CTC-er kan gi verdifull innsikt i den overordnede sykdomsprofilendringen og fører derfor til bedre valg/justering av behandlingen.

Fremgangsmåter: Det er utviklet en trippel-antistoff-enzym-kanaliserende multiplekset proteinmikroarrayplattform for å detektere fosforyleringen av målmolekyler. Denne multipleksede proteinmikroarrayplattformen benytter dannelse av et unikt immunkompleks via samtidig lokalisering av to detektorenzymkonjugerte antistoffer straks målproteinene er innfanget på

mikroarrayoverflaten. Kanaliseringshendelsene mellom de to nærliggende detektorenzymene sikrer profilering av reseptortyrosinkinaser (RTK-er) med en sensitivitet på enkeltcellenivå. Spesifisitet for detektering av fosforylerte mål økes betydelig i og med kravet til samtidig binding av tre antistoffer. For å validere fremgangsmåten på klinisk prøver ble det utført assayer på aktiverte CTC-er fra 75 kreftpasienter på forskjellige behandlingsregimer.

Resultater: Vi identifiserte 6 pasienter (8 %) med aktivert HER1, 6 pasienter (8 %) med aktivert HER2 og 14 (18,5 %) pasienter med dobbelt RTK-aktivering i deres CTC-er. 25 normalprøver viste ingen detekterbar HER1/HER2-aktivering. Vi observerte også avvik mellom HER2-aktiveringsstatus mellom CTC-er og deres tilsvarende primære HER2-IHC-status hos brystkreftpasienter. Det ble detektert CTC-er med aktivert HER2 hos 6 av 16 (38 %) pasienter med HER2-negativ primær brystkreft. 2 av 5 (40 %) HER2-positive pasienter hadde dessuten CTC-er med ingen åpenbar HER2-aktivering.

Konklusjon: Den multipleksede proksimitetsmedierte plattformen tilveiebringer med fordel sensitivitet på enkeltcellenivå for detektering av aktiveringen av RTK-er i en begrenset prøvemengde. CTC-er detektert i krefttyper i det metastatiske stadiet kan således oppnås og profileres for å tilveiebringe verdifull informasjon og påvirke klinisk praksis.

Eksempel 20. Fremgangsmåte for å detektere aktivering av reseptortyrosinkinaser på metastatiske lesjoner ved hjelp av et proksimitetsmediert mikroarray-immunassay.

Bakgrunn: Endringene i tumorreseptorekspresjonsstatus mellom primærsted og metastatiske lesjoner er kjent for å forekomme med en vesentlig hyppighet (~15 til 20 %). Fremgangsmåter for profilering av aktiveringsmønstre for reseptortyrosinkinase (RTK) på metastatiske tumorer kan følgelig tilveiebringe verdifull innsikt i den skiftende sykdomspatogenesen.

Fremgangsmåter: Det er utviklet en hittil ukjent teknologi som er i stand til spesifikt å detektere fosforyleringshendelser i RTK-er i ErbB-familien. Denne multipleksede proteinmikroarrayplattformen benytter dannelse av et unikt immunkompleks som krever samtidig lokalisering av to

detektorenzymkonjugerte antistoffer straks målproteinene er innfanget på mikroarrayoverflaten. Kanaliseringshendelsene mellom de to nærliggende detektorenzymene (f.eks. glukoseoksidase og pepperrotperoksidase) sikrer profilering av RTK-er med ekstrem sensitivitet. Den analytiske spesifisiteten forbedres faktisk vesentlig i og med kravet til samtidig binding av tre forskjellige antistoffer. Vi anvendte 29 fryste brystkreftvev (stadium II til IV) som et modellsystem for RTK-profilering av metastatisk finnålsaspirat (mFNA).

Resultater: Tumorvevsprøvene tatt ved hjelp av G23 gauge nåler ble lysert i 100 µl lyseringsbuffer, og de løselige prøvene (inneholdende -100 til 200 µg protein) ble analysert for RTK-aktiveringsstatus. Av 29 FNA-prøver viste 27 % (8/29) svært aktivert HER2, og 2 prøver (6 %) viste et middels nivå av aktivert HER2. Én av prøvene med middels HER2-aktivering viste også et middels nivå av HER1-aktivering. 2 av de 8 HER2-aktiverte prøvene viste også et vesentlig nivå av HER1-aktivering. Blant de 19 aktiverte HER2-negative prøvene viste 3 et moderat nivå av HER1-aktivering.

Konklusjon: Den multipleksede proksimitetsmedierte plattformen tilveiebringer med fordel sensitivitet på enkeltcellenivå for målfosforyleringshendelser for detektering av aktiveringen av RTK-er i en begrenset mengde av mFNA-vevsprøve. Evnen til å profilere tumorer ved forskjellige metastatiske steder tilveiebringer derfor verdifull informasjon om det differensielle metastatiske potensialet. Minimalinvasive mFNA-enkeltpassasjeprøver kan således benyttes til å skreddersy behandlingsalternativer etter hvert som sykdomsprofilen endrer seg.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte omfattende:

(a) lysering av celler i en brysttumor som er isolert etter administrering av et anticancer-legemiddel, eller før inkubering med et anticancer-legemiddel for å produsere en cellulær ekstrakt;

(b) detektering av en aktiveringsstatus for én eller flere analytter i den cellulære ekstrakten ved hjelp av et assay omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer som er spesifikke for den ene eller flere analyttene, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på et fast underlag, og hvor assayet omfatter:

(i) inkubering av den cellulære ekstrakten med flertallet av fortynningsseriene av innfangingsantistoffer for å danne et flertall av innfangne analytter;

(ii) inkubering av flertallet av innfangne analytter med deteksjonsantistoffer omfattende et flertall av aktiveringsstatusuavhengige antistoffer og et flertall av aktiveringsstatusavhengige antistoffer som er spesifikke for de tilsvarende analyttene for å danne et flertall av detekterbare innfangne analytter,

hvor de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene merkes med glukoseoksidase, hvor glukoseoksidasen og de aktiveringsstatusuavhengige antistoffene konjugeres til et sulfhydrylaktivert dekstranmolekyl, hvor de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med et første medlem av et signalamplifikasjonspar, og hvor glukoseoksidasen genererer et oksideringsmiddel som kanaliserer til og reagerer med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet;

(iii) inkubering av flertallet av detekterbare innfangne analytter med et andre medlem av signalamplifikasjonsparet for å generere et amplifisert signal; og

(iv) detektering av det amplifiserte signalet generert fra det første og andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet; og

(c) bestemmelse av hvorvidt anticancer-legemiddelet er egnet eller uegnet til behandling av brysttumoren ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert

under fravær av anticancer-legemiddelet, hvor fremgangsmåten er for valg av et egnet anticancer-legemiddel for behandling av en brysttumor.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor trinn (c) i stedet omfatter identifikasjon av brysttumoren som responsiv eller ikke-responsiv på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, hvor fremgangsmåten er for identifikasjon av en brysttumors respons på behandling med et anticancer-legemiddel.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor trinn (c) i stedet omfatter prediksjon av sannsynligheten for at pasienten vil respondere på behandling med anticancer-legemiddelet ved sammenligning av aktiveringsstatus detektert for den ene eller flere analyttene med en referanseaktiveringsprofil generert under fravær av anticancer-legemiddelet, hvor fremgangsmåten er for prediksjon av responsen til en pasient med en brysttumor på behandling med et anticancer-legemiddel.

4. En fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor brysttumoren er avledet fra en pasient med duktalt karsinom, hvor det duktale karsinomet foretrukket er invasivt duktalt karsinom eller duktalt karsinom in situ, eller
hvor brysttumoren er avledet fra en pasient med lobulært karsinom, hvor det lobulære karsinomet foretrukket er invasivt lobulært karsinom eller lobulært karsinom in situ.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor cellene omfatter sirkulerende celler i brysttumoren, hvor de sirkulerende cellene foretrukket er isolert fra en prøve ved immunmagnetisk separasjon, hvor prøven foretrukket er valgt fra gruppen bestående av fullblod, serum, plasma, duktal lavage, brystvorteaspirat, lymfe, benmargsaspirat, urin, saliva, finnålsaspirat og kombinasjoner derav, hvor de sirkulerende cellene foretrukket er valgt fra gruppen bestående av sirkulerende tumorceller, sirkulerende endotelceller, sirkulerende endoteliale progenitorceller, kreftstamceller, disseminerte tumorceller og kombinasjoner derav.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor cellene er isolert fra tumorvev, hvor tumorvevet foretrukket er primærtumorvev eller metastatisk tumorvev, hvor cellene foretrukket er isolert fra tumorvev som en finnålsaspiratprøve.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor de isolerte cellene er stimulert *in vitro* med vekstfaktorer.

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor anticancer-legemiddelet er valgt fra gruppen bestående av et monoklonalt antistoff, tyrosinkinaseinhibitor, kjemoterapeutisk middel, terapeutisk hormonmiddel, radioterapeutisk middel, vaksine og kombinasjoner derav,
hvor det monoklonale antistoffet foretrukket er valgt fra gruppen bestående av trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbitux®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab (Rituxan®), tositumomab (BEXXAR®) og kombinasjoner derav,
hvor tyrosinkinaseinhibitoren foretrukket er valgt fra gruppen bestående av gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (Tykerb®), kanertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib mesylat (Gleevec®), leflunomid (SU101), vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474) og kombinasjoner derav,
hvor det kjemoterapeutiske middelet foretrukket er valgt fra gruppen bestående av pemetrexed (ALIMTA®), gemcitabin (Gemzar®), sirolimus (rapamycin), rapamycinanaloger, platinaforbindelser, karboplatin, cisplatin, satraplatin, paklitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) og kombinasjoner derav,
hvor det terapeutiske hormonmiddelet foretrukket er valgt fra gruppen bestående av aromataseinhibitorer, selektive østrogenreseptormodulatorer, steroider, finasterid, gonadotropinfrisettende hormonagonister, farmasøytisk akseptable salter derav, stereoisomerer derav, derivater derav, analoger derav og kombinasjoner derav,
hvor det radioterapeutiske middelet foretrukket er valgt fra gruppen bestående av ^{47}Sc, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{89}Sr, ^{86}Y, ^{87}Y, ^{90}Y, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{111}In, ^{117m}Sn, ^{149}Pm, ^{153}Sm, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{211}At, ^{212}Bi og kombinasjoner derav.

9. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor den ene eller flere analyttene omfatter et flertall av signaltransduksjonsmolekyler,
hvor flertallet av signaltransduksjonsmolekylene foretrukket er valgt fra gruppen bestående av reseptortyrosinkinaser, ikke-reseptortyrosinkinaser, tyrosinkinasesignaliseringskaskadekomponenter, nukleære hormonreseptorer, nukleære reseptorkoaktivatorer, nukleære reseptorrepressorer og kombinasjoner derav,
hvor flertallet av signaltransduksjonsmolekylene foretrukket er valgt fra gruppen bestående av EGFR (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Eph-en, Eph-b, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 og kombinasjoner derav, eller
hvor flertallet av signaltransduksjonsmolekylene foretrukket er valgt fra gruppen bestående av ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, ER, PR og kombinasjoner derav.

10. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor aktiveringsstatus er valgt fra gruppen bestående av en fosforyleringsstatus, ubiquineringsstatus, komplekseringsstatus og kombinasjoner derav.

11. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor det faste underlaget er valgt fra gruppen bestående av glass, plast, brikker, stifter, filtere, kuler, papir, membran, fiberbunter og kombinasjoner derav.

12. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor innfangingsantistoffene fastholdes på det faste underlaget i et adresserbart array.

13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes direkte med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet, eller
hvor de aktiveringsstatusavhengige antistoffene merkes med det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet via binding mellom et første medlem av et bindingspar konjugert til de aktiveringsstatusavhengige antistoffene og et andre medlem av bindingsparet konjugert til det første medlemmet av

signalamplifikasjonsparet, hvor det første medlemmet av bindingsparet foretrukket er biotin, og hvor det andre medlemmet av bindingsparet foretrukket er streptavidin.

14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor det sulfhydrylaktiverte dekstranmolekylet har en molekylvekt på 500 kDa.

15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 3, hvor oksideringsmiddelet er hydrogenperoksid (H_2O_2).

16. Fremgangsmåte ifølge krav 15, hvor det første medlemmet av signalamplifikasjonsparet er en peroksidase, foretrukket pepperrotperoksidase (HRP), og/eller hvor det andre medlemmet av signalamplifikasjonsparet er et tyramidreagens, foretrukket biotintyramid.

17. Fremgangsmåte ifølge krav 16, hvor det amplifiserte signalet er generert ved peroksidaseoksidisering av biotintyramidet for å produsere et aktivert tyramid.

18. Fremgangsmåte ifølge krav 17, hvor det aktiverte tyramidet er direkte detektert, eller hvor det aktiverte tyramidet er detektert ved tilsetning av et signaldeteksjonsreagens, hvor signaldeteksjonsreagenset foretrukket er et streptavidinmerket fluorofor eller en kombinasjon av en streptavidinmerket peroksidase og et kromogent reagens, hvor det kromogene reagenset foretrukket er 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB).

19. Anvendelse av et array omfattende et flertall av fortynningsserier av innfangingsantistoffer fastholdt på et fast underlag, hvor innfangingsantistoffene i hver fortynningsserie er spesifikke for én eller flere analytter tilsvarende en komponent av en signaltransduksjonsvei i en cellulær ekstrakt, for utførelse av fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av krav 1–3.

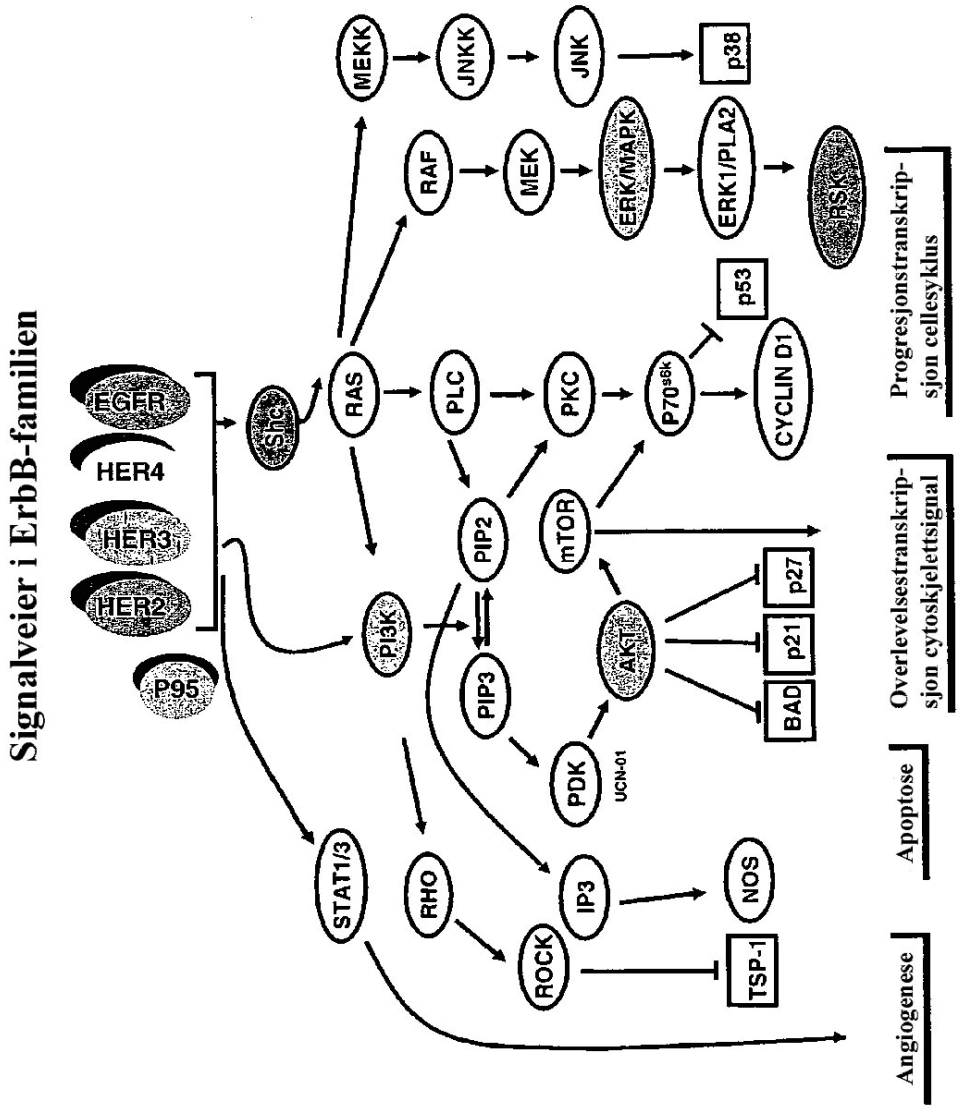

Signalveier i ErbB-familien
EGFR
HER4
HER3
HER2
P95
Shc
RAS
MEKK
JNKK
JNK
p38
RAF
MEK
ERK/MAPK
ERK1/PLA2
RSK
PLC
PKC
P70s6k
p53
CYCLIN D1
PIP2
mTOR
PI3K
PIP3
AKT
p27
p21
BAD
PDK
UCN-01
STAT1/3
RHO
IP3
NOS
ROCK
TSP-1
Angiogenese
Apoptose
Overlevelsestranskrip-sjon cytoskjelettsignal
Progresjonstranskrip-sjon cellesyklus

FIG. 1

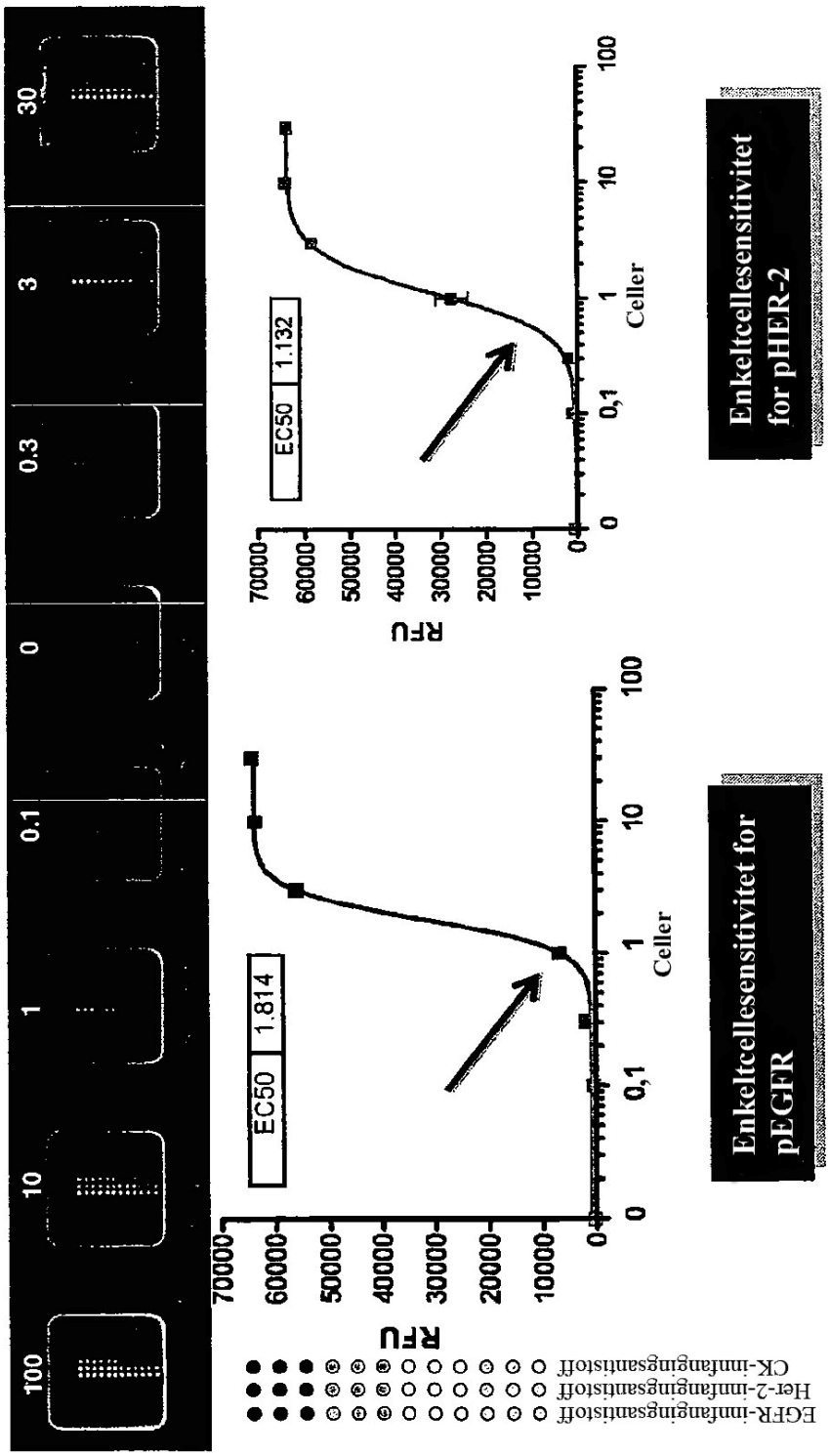
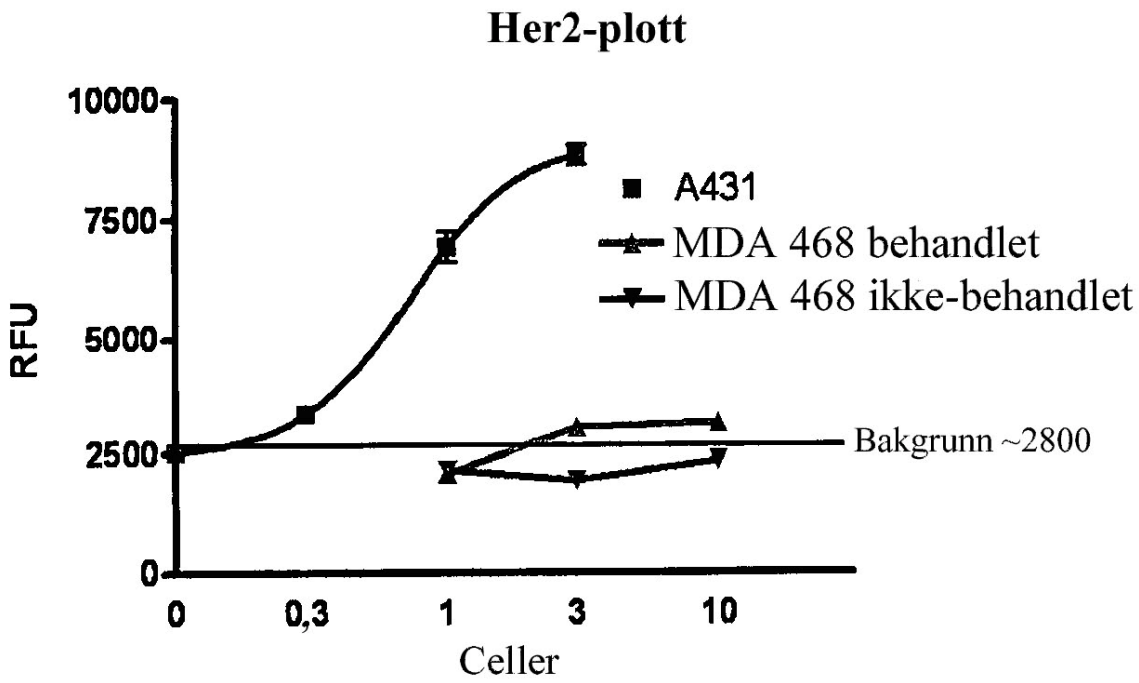
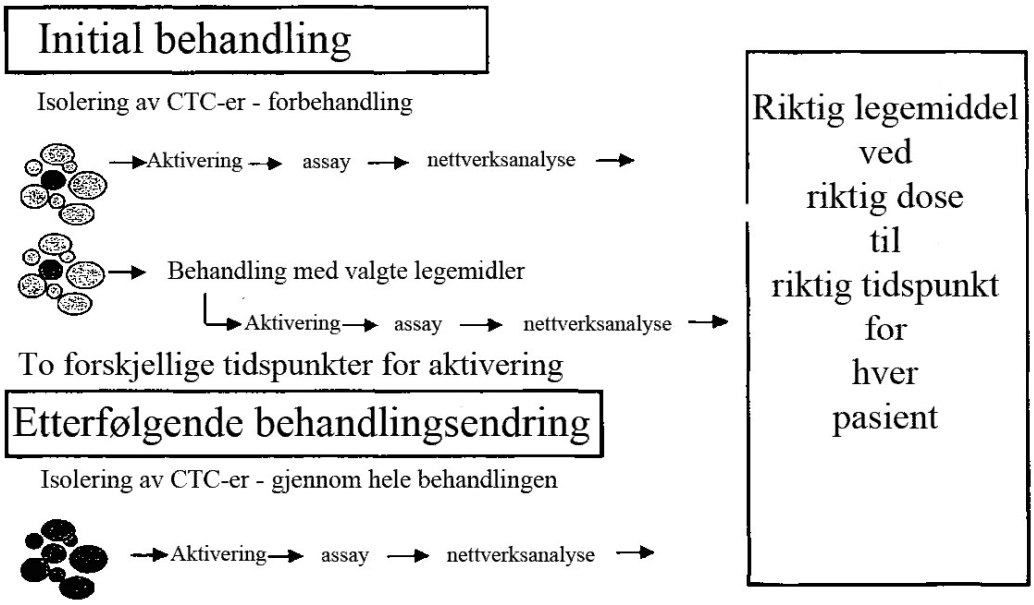

100
10
1
0.1
0
0.3
3
30
EGFR-inntrangingsantistoff
Her-2-inntrangingsantistoff
CK-inntrangingsantistoff
RFU
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
EC50
1.814
0,1
1
10
100
Celler
Enkeltcellesensitivitet for pEGFR
EC50
1.132
Celler
Enkeltcellesensitivitet for pHER-2

FIG. 2

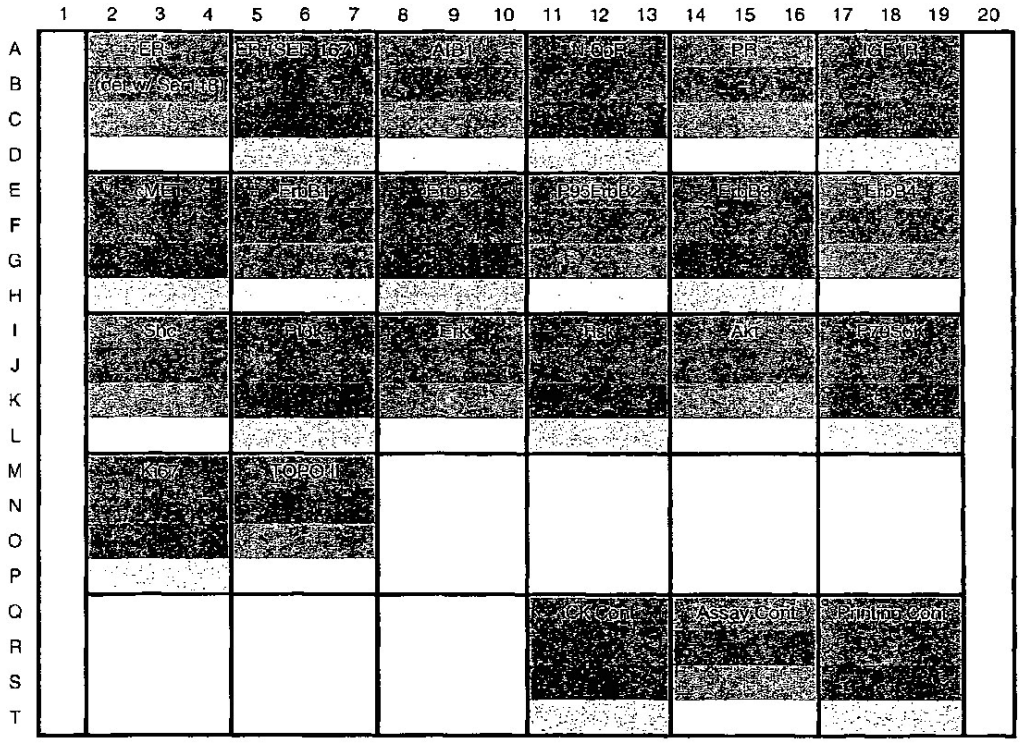


A431: HER-1- og HER-2-positiv; MD-MBA 468: bare HER-1-positiv

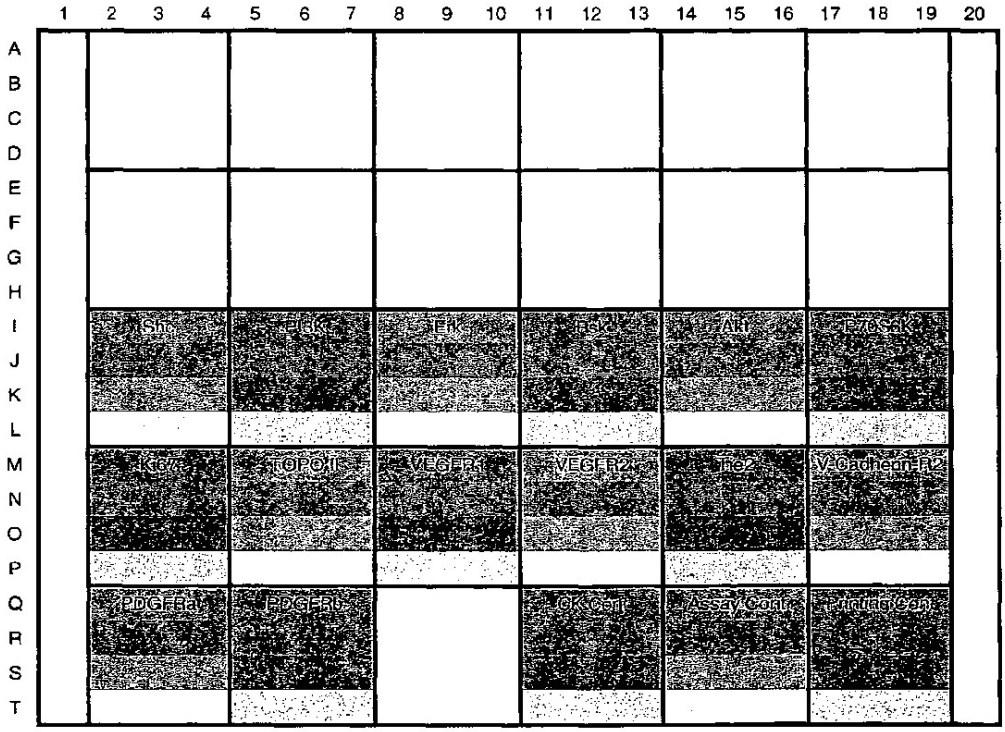
FIG. 3


Initial behandling
Isolering av CTC-er - forbehandling
Aktivering
assay
nettverksanalyse
Behandling med valgte legemidler
Aktivering
assay
nettverksanalyse
To forskjellige tidspunkter for aktivering
Etterfølgende behandlingsendring
Isolering av CTC-er - gjennom hele behandlingen
Aktivering
assay
nettverksanalyse
Riktig legemiddel ved riktig dose til riktig tidspunkt for hver pasient

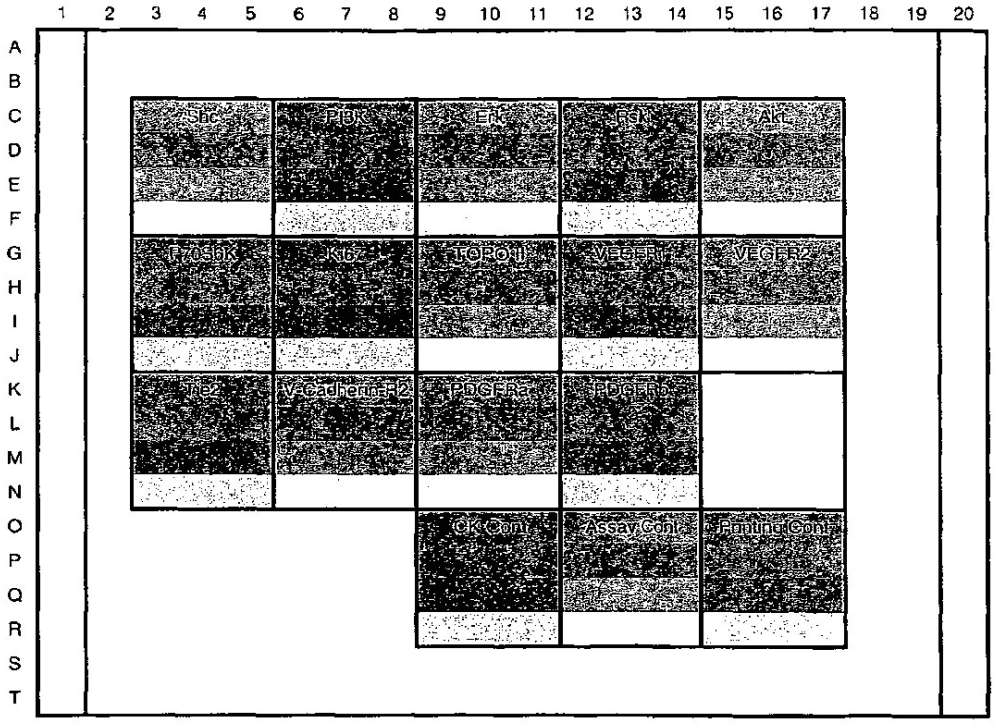
RTK-signalveibrikke



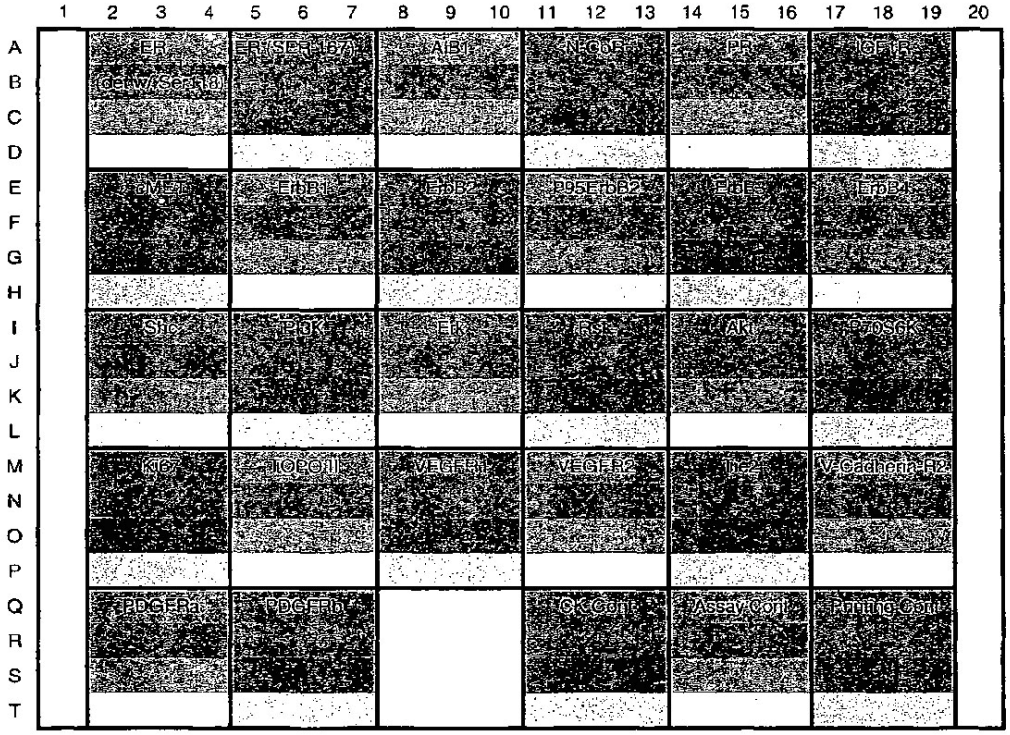
Angiogenesebrikke



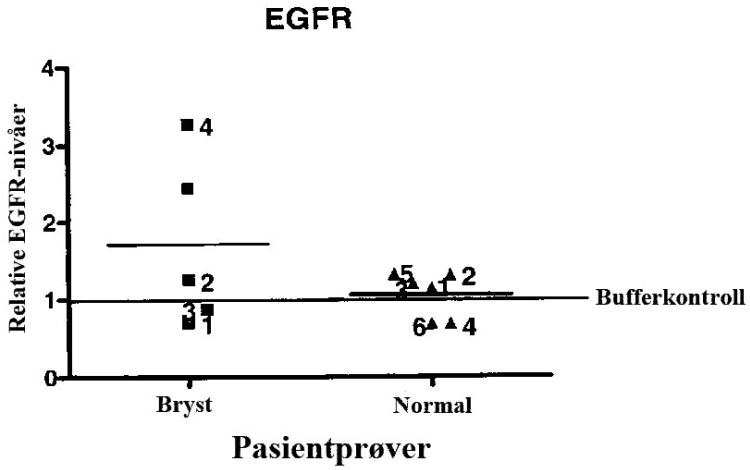
Alternativ angiogenesebrikke

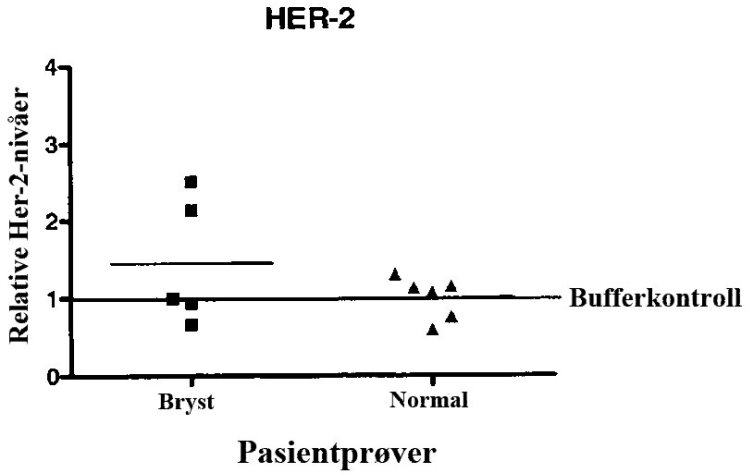


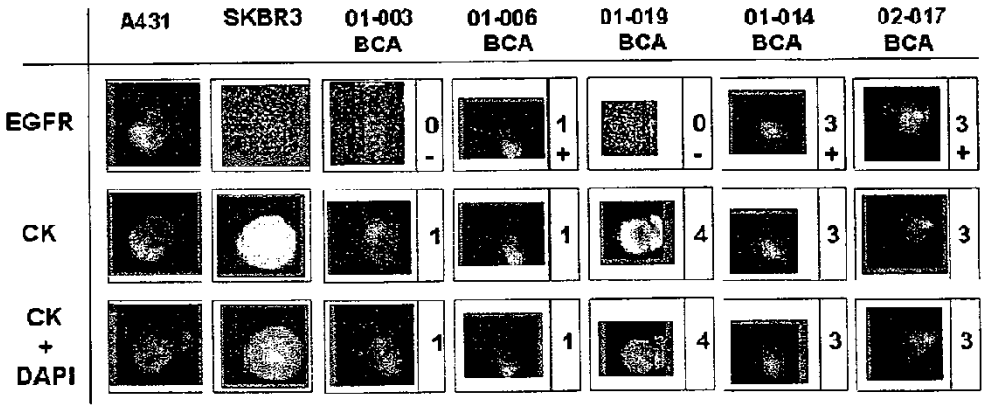
Kombinert brikke

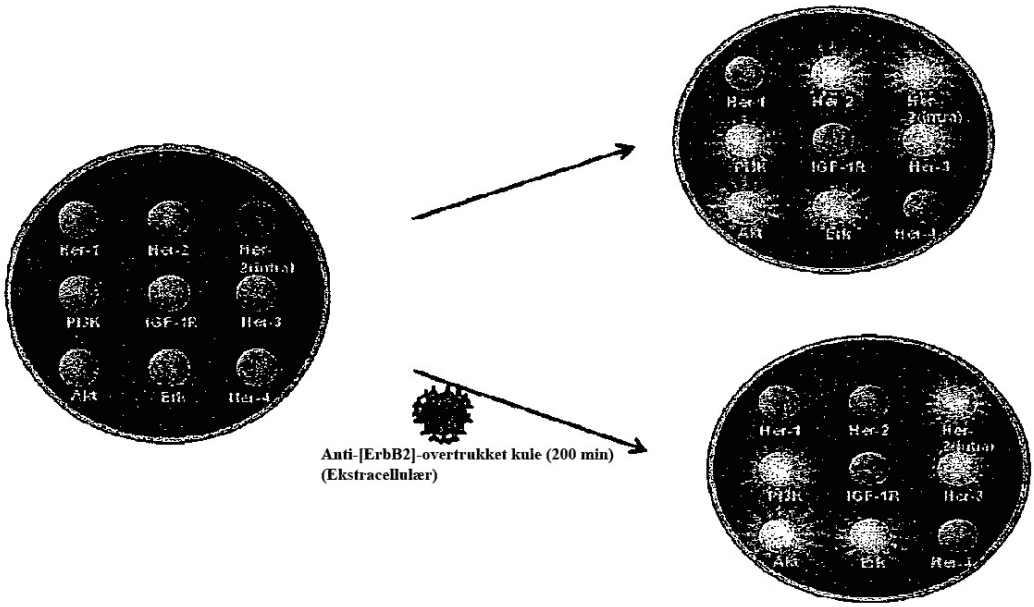


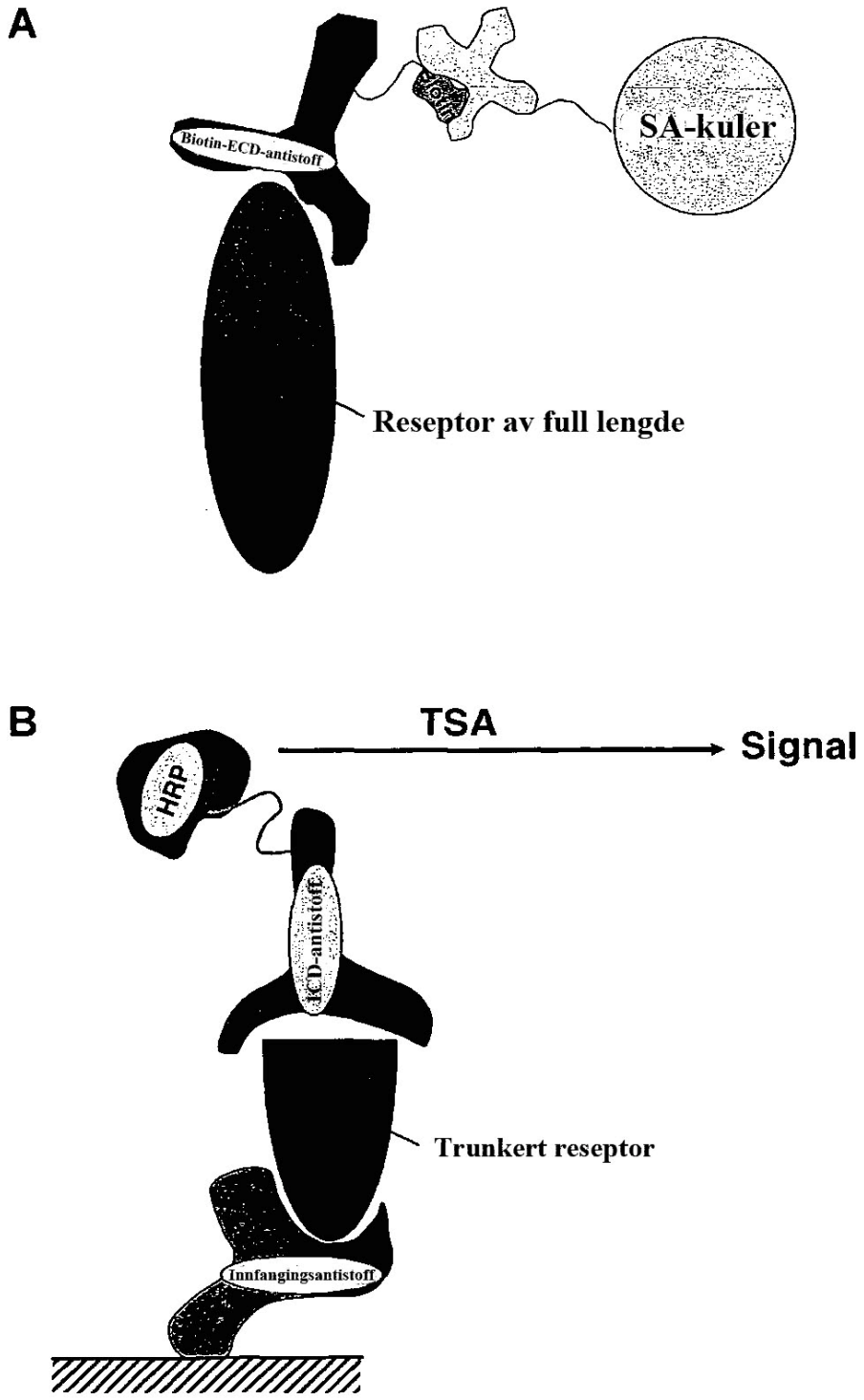
	1	2 3 4	5 6 7	8 9 10	11 12 13	14 15 16	17 18 19	20
A B C D		ER	ER (SER 118)	ER (SER 167)	ER-AIB1	ER-N-CoR	EGFR	
E F G H		PR	IGF1R	Shc	PI3K	Erk	ErbB2	
I J K L		Rsk	Akt	P70S6K	Ki67	TOPO II	P95ErbB2	
M N O P		VEGFR1	VEGFR2	Tie2	V-Cadherin-R2	PDGFRa	ErbB3	
Q R S T		PDGFRb	CK Cont	Assay Cont		Printing Cont	ErbB4	


EGFR
Relative EGFR-nivåer
4
3
2
1
0
Bufferkontroll
Bryst
Normal
Pasientprøver


HER-2
Relative Her-2-nivåer
4
3
2
1
0
Bufferkontroll
Bryst
Normal
Pasientprøver


A431
SKBR3
01-003 BCA
01-006 BCA
01-019 BCA
01-014 BCA
02-017 BCA
EGFR
CK
CK + DAPI
0 -
1 +
0 -
3 +
3 +
1
1
4
3
3
1
1
4
3
3


Her-1
Her-2
Her-2(mut)
PI3K
IGF-1R
Her-3
Akt
Erk
Her-4
Anti-[ErbB2]-overtrukket kule (200 min)
(Ekstracellulær)


A
Biotin-ECD-antistoff
SA-kuler
Reseptor av full lengde
B
TSA
Signal
HRP
ECD-antistoff
Trunkert reseptor
Innfangingsantistoff

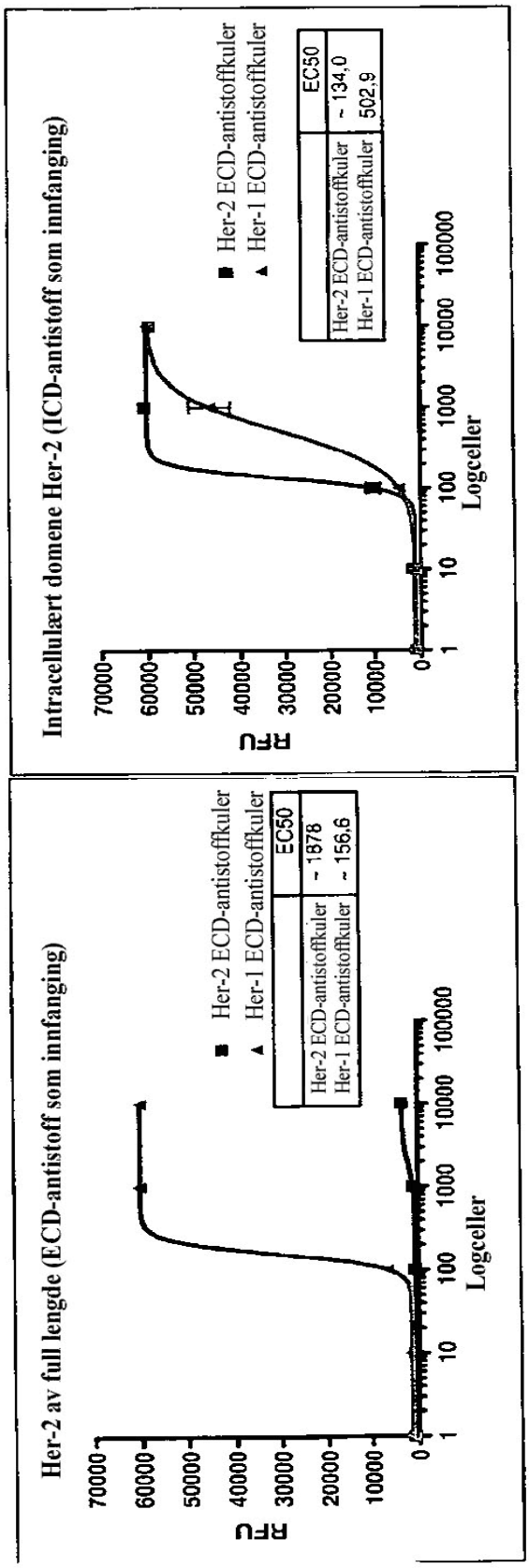

Her-2 av full lengde (ECD-antistoff som innfanging)
RFU
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
10
100
1000
10000
100000
Logceller
Her-2 ECD-antistoffkuler
Her-1 ECD-antistoffkuler
EC50
Her-2 ECD-antistoffkuler ~ 1878
Her-1 ECD-antistoffkuler ~ 156,6
Intracellulært domene Her-2 (ICD-antistoff som innfanging)
RFU
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
10
100
1000
10000
100000
Logceller
Her-2 ECD-antistoffkuler
Her-1 ECD-antistoffkuler
EC50
Her-2 ECD-antistoffkuler ~ 134,0
Her-1 ECD-antistoffkuler 502,9

FIG. 15

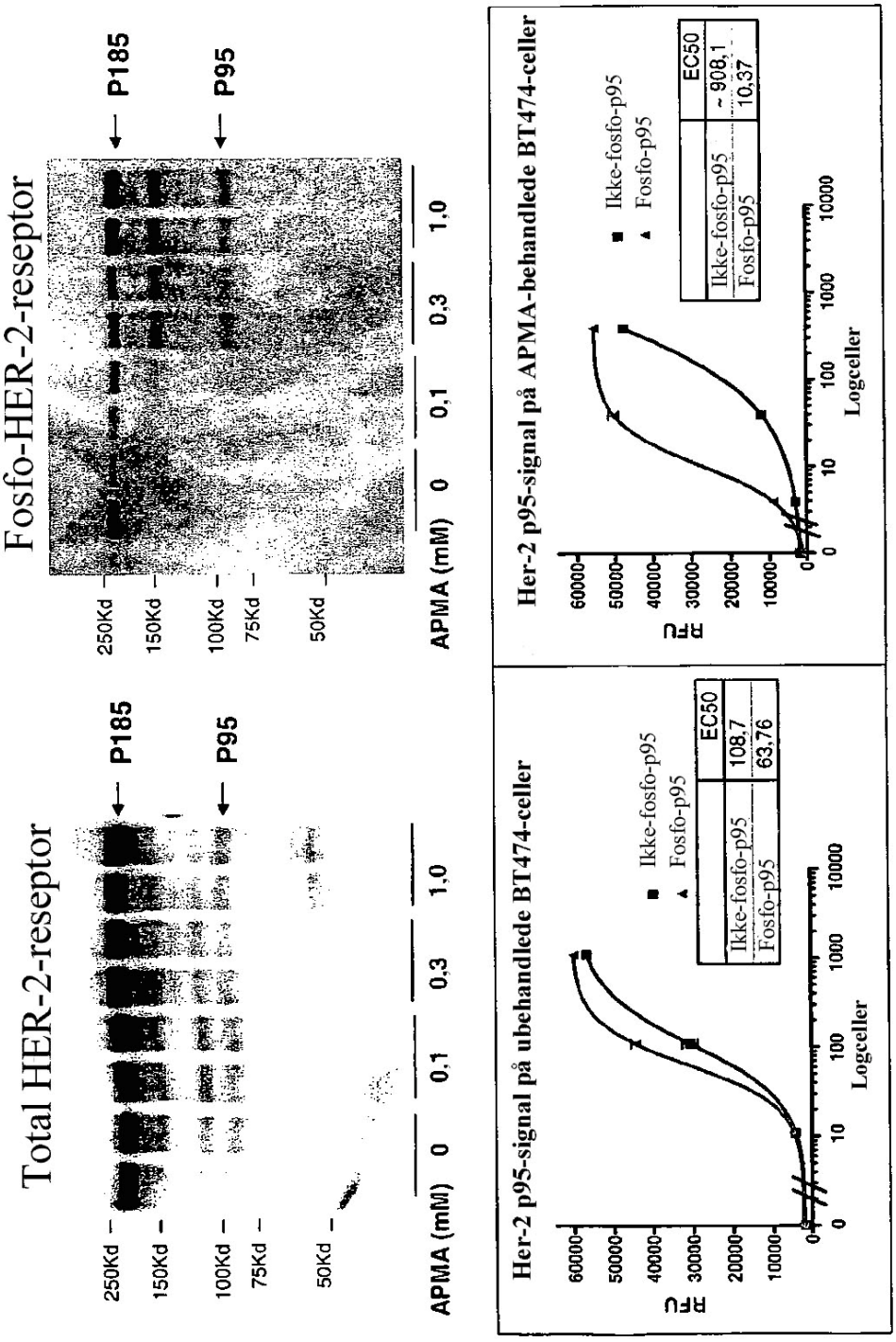
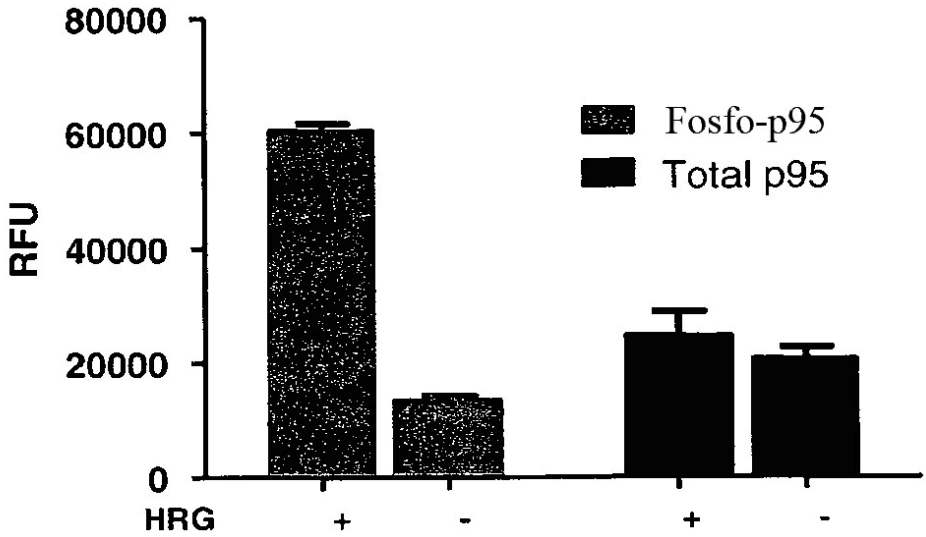

Total HER-2-reseptor
P185
P95
250Kd
150Kd
100Kd
75Kd
50Kd
APMA (mM) 0 0,1 0,3 1,0
Fosfo-HER-2-reseptor
P185
P95
250Kd
150Kd
100Kd
75Kd
50Kd
APMA (mM) 0 0,1 0,3 1,0
Her-2 p95-signal på ubehandlede BT474-celler
RFU
Logceller
Ikke-fosfo-p95
Fosfo-p95
EC50
Ikke-fosfo-p95 108,7
Fosfo-p95 63,76
Her-2 p95-signal på APMA-behandlede BT474-celler
RFU
Logceller
Ikke-fosfo-p95
Fosfo-p95
EC50
Ikke-fosfo-p95 ~ 908,1
Fosfo-p95 10,37

FIG. 16


80000
60000
40000
20000
0
RFU
Fosfo-p95
Total p95
HRG
+
-
+
-

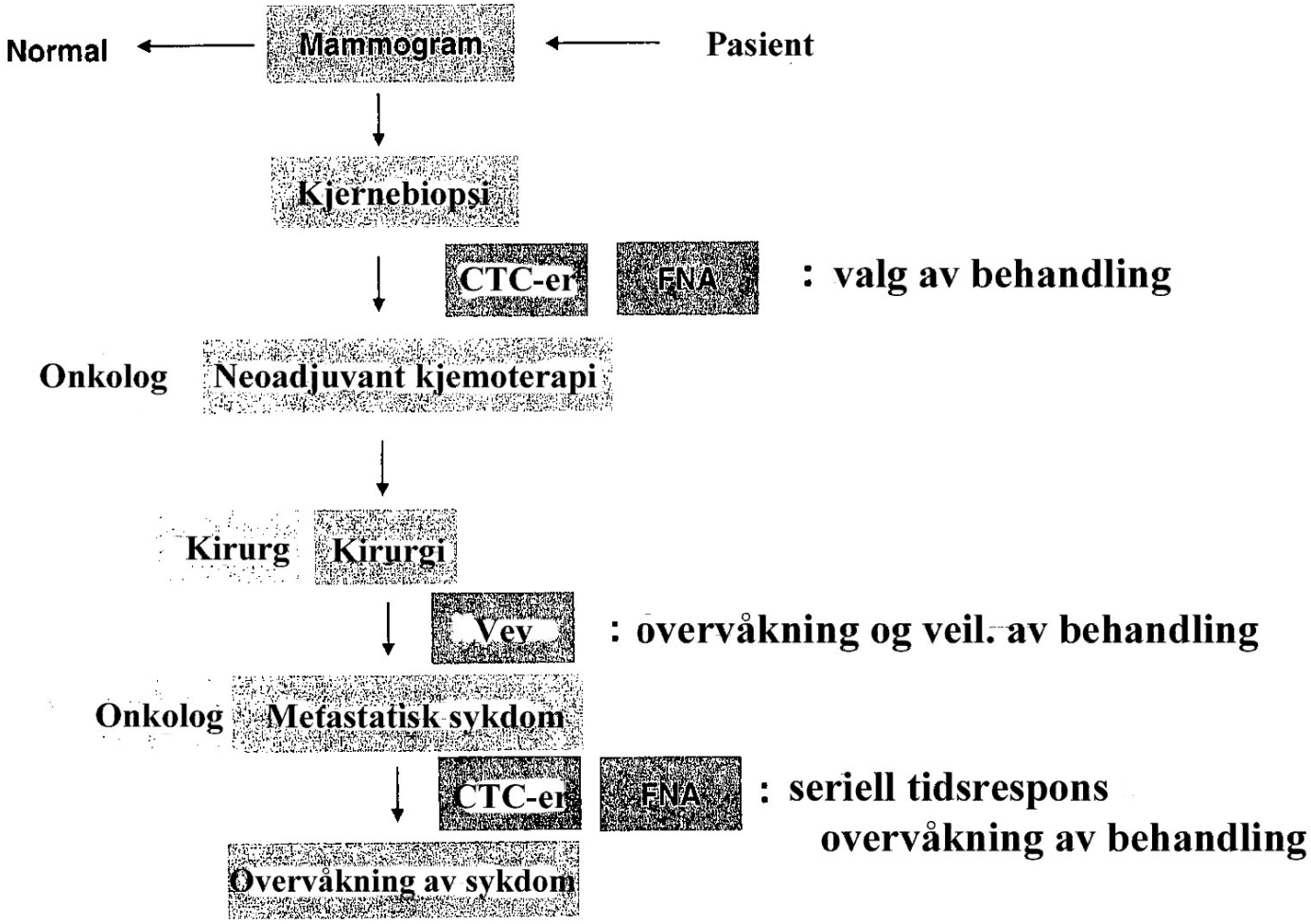
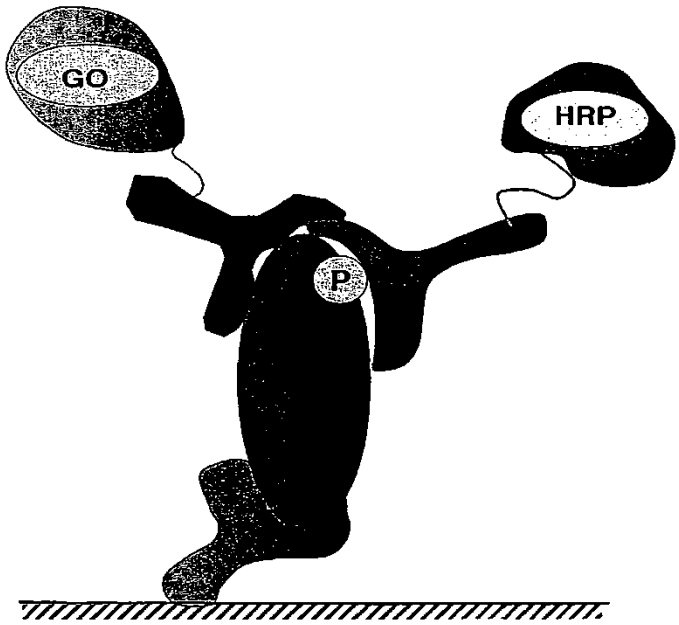
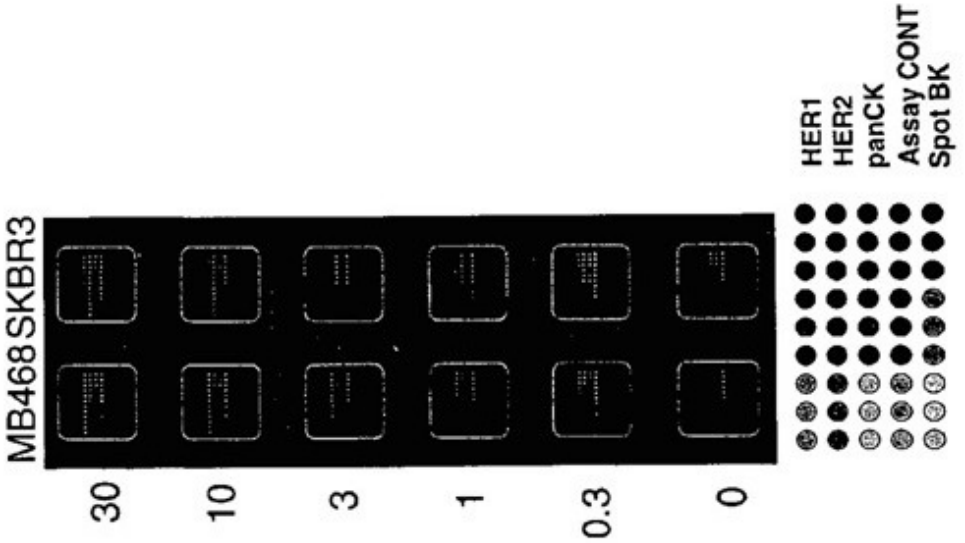

Normal
Mammogram
Pasient
Kjernebiopsi
CTC-er
FNA
: valg av behandling
Onkolog
Neoadjuvant kjemoterapi
Kirurg
Kirurgi
Vev
: overvåkning og veil. av behandling
Onkolog
Metastatisk sykdom
CTC-er
FNA
: seriell tidsrespons
overvåkning av behandling
Overvåkning av sykdom

FIG. 18


GO
HRP
P


MB468 SKBR3
30
10
3
1
0.3
0
HER1
HER2
panCK
Assay CONT
Spot BK

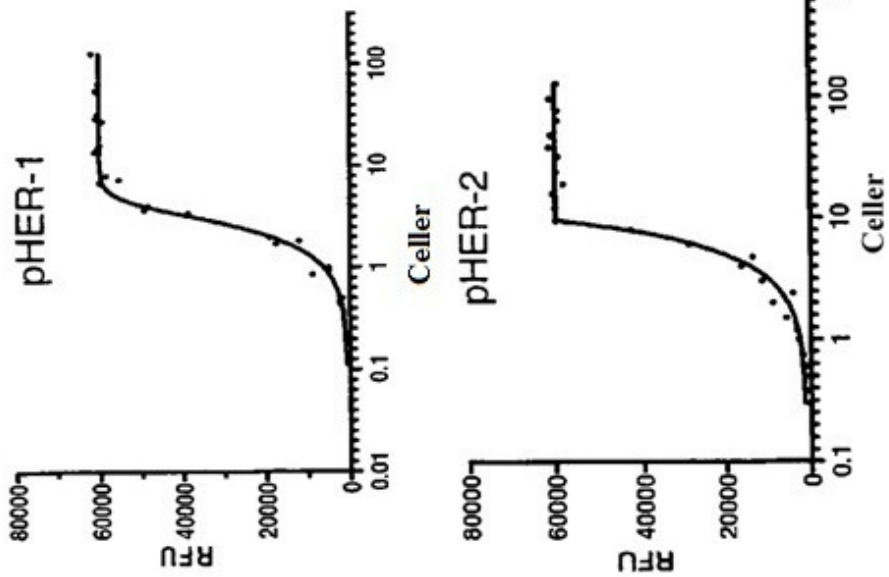
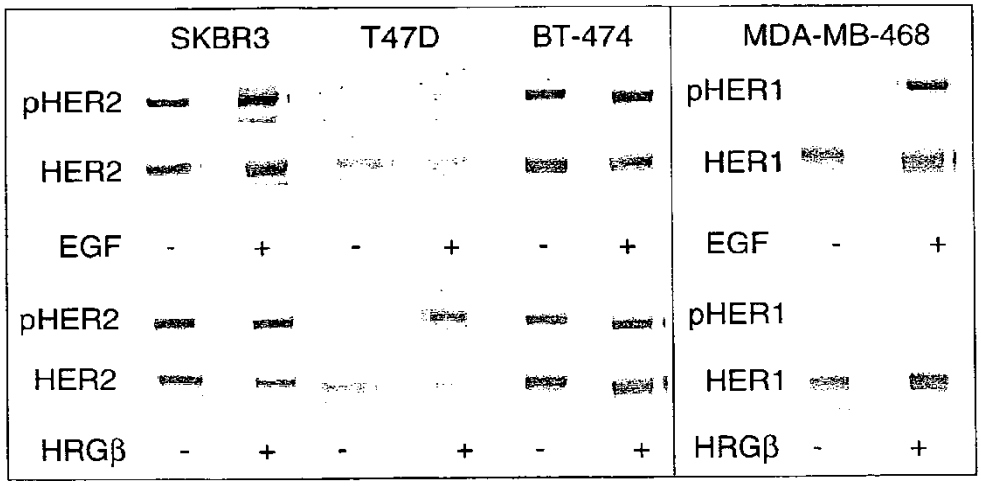

pHER-1
RFU
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
100
Celler
pHER-2
RFU
80000
60000
40000
20000
0
0.1
1
10
100
1000
Celler

FIG. 20


SKBR3
T47D
BT-474
MDA-MB-468
pHER2
HER2
EGF
- +
- +
- +
pHER2
HER2
HRGβ
- +
- +
- +
pHER1
HER1
EGF
- +
pHER1
HER1
HRGβ
- +

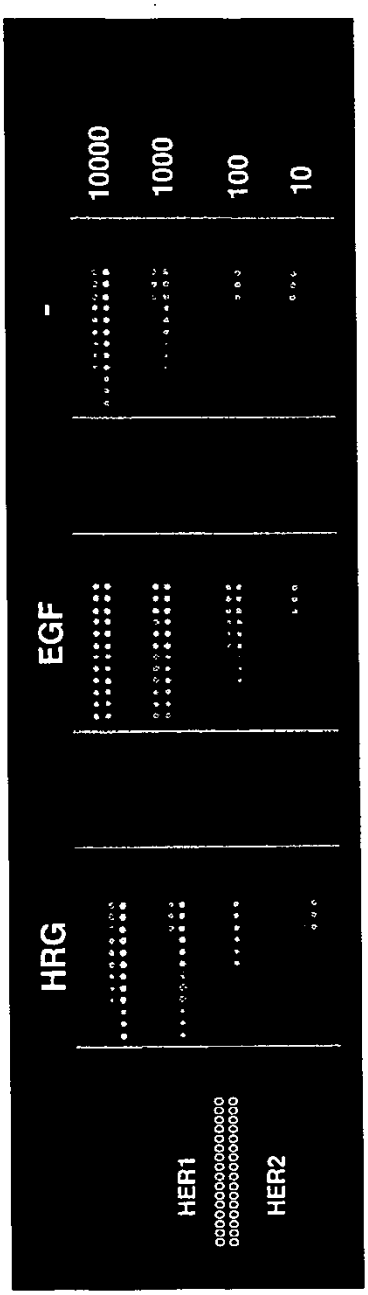
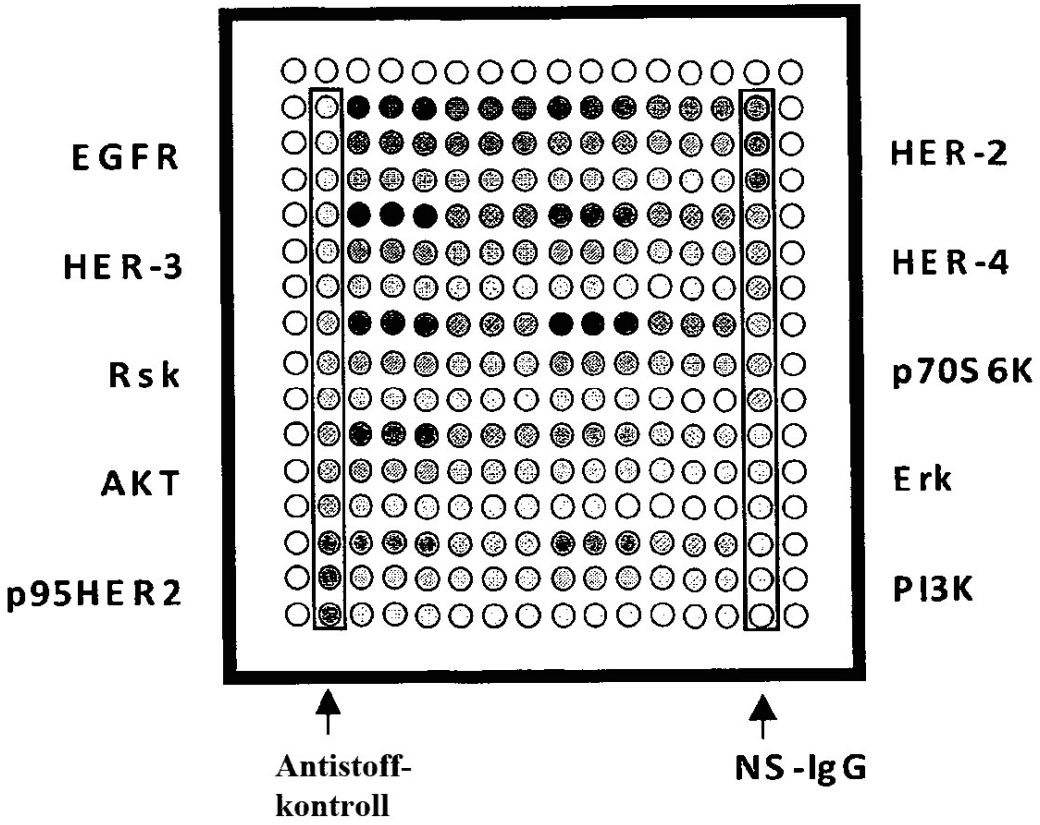


FIG. 22

ErbB-signalveiarray